(11) Número de Publicação: **PT 2316852 E**

(51) Classificação Internacional:
C07K 16/18 (2014.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2003.11.07**

(30) Prioridade(s): **2002.11.08 US 425063 P**
2002.11.08 US 425073 P
2003.01.10 EP 03447005
2003.06.23 WO PCT/EP03/06581
2003.07.08 WO PCT/EP03/07313

(43) Data de publicação do pedido: **2011.05.04**

(45) Data e BPI da concessão: **2014.03.05**
117/2014

(73) Titular(es):
ABLYNX N.V.
TECHNOLOGIEPARK 21 9052 GHENT-ZWIJNAARDE **BE**

(72) Inventor(es):
KAREN SILENCE **BE**
MARC LAUWEREYS **BE**
TORSTEN DREIER **DE**

(74) Mandatário:
NUNO MIGUEL OLIVEIRA LOURENÇO
RUA CASTILHO, Nº 50 - 9º 1269-163 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS DE DOMÍNIO ÚNICO ESTÁVEIS**

(57) Resumo:
A INVENÇÃO REFERE-SE A UM MÉTODO ADEQUADO PARA A ADMINISTRAÇÃO DE MOLÉCULAS DE PROTEÍNAS TERAPÊUTICAS POR VIA ORAL, SUBLINGUAL, TÓPICA, INTRAVENOSA, SUBCUTÂNEA, NASAL, VAGINAL, RETAL OU POR INALAÇÃO, DE MODO A EVITAR A INATIVAÇÃO, POR UTILIZAÇÃO DE POLIPÉPTIDOS VHH DERIVADOS DE ANTICORPOS DE CAMELIDAE. A INVENÇÃO REFERE-SE AINDA ÀS REFERIDAS MOLÉCULAS TERAPÊUTICAS. A INVENÇÃO PROPORCIONA AINDA UM MÉTODO PARA A ENTREGA DE MOLÉCULAS TERAPÊUTICAS PARA O INTERIOR DE CÉLULAS. A INVENÇÃO REFERE-SE TAMBÉM A MOLÉCULAS ANTI-IGE TERAPÊUTICAS.

RESUMO

"ANTICORPOS DE DOMÍNIO ÚNICO ESTÁVEIS"

A invenção refere-se a um método adequado para a administração de moléculas de proteínas terapêuticas por via oral, sublingual, tópica, intravenosa, subcutânea, nasal, vaginal, retal ou por inalação, de modo a evitar a inativação, por utilização de polipéptidos VHH derivados de anticorpos de *Camelidae*. A invenção refere-se ainda às referidas moléculas terapêuticas. A invenção proporciona ainda um método para a entrega de moléculas terapêuticas para o interior de células. A invenção refere-se também a moléculas anti-IgE terapêuticas.

DESCRIÇÃO

"ANTICORPOS DE DOMÍNIO ÚNICO ESTÁVEIS"

Campo da invenção

A presente invenção fornece construções polipeptídicas heteroespecíficas que compreendem um ou mais anticorpos de domínio único, tal como definido nas reivindicações, as referidas construções possuem uma estabilidade melhorada *in vivo* e a sua utilização é no diagnóstico e terapia.

Antecedentes da invenção

A terapêutica polipeptídica e, em especial, as terapêuticas baseadas em anticorpos têm um significativo potencial como fármacos, porque têm uma aperfeiçoada especificidade para o seu alvo e uma baixa toxicidade inerente. No entanto, de modo a ser eficaz como agente terapêutico, o seu perfil farmacocinético deve ser optimizado. A maioria das aplicações atuais de anticorpos são para distúrbios agudos. No entanto, existem significativas oportunidades para desenvolver anticorpos terapêuticos para doenças crónicas. Tal irá exigir grandes doses de proteína ao longo de um longo período de tempo. Como o custo da produção de anticorpos em células de mamíferos é elevado, o desenvolvimento de anticorpos terapêuticos tradicionais para estas aplicações tem sido desencorajada. Uma abordagem alternativa tem sido a de expressar fragmentos de anticorpos, tal como Fab ou Fv de cadeia simples em sistemas de expressão microbianos, tais como leveduras e bactérias. Estes fragmentos têm, contudo, tempos de circulação *in vivo* muito curtos.

Algumas das abordagens iniciais para aumentar a circulação na corrente sanguínea de proteínas e péptidos foram baseadas na modificação química, tais como a peguilação (US 4.179.337). Exemplos de tais produtos consistem em PEG-intrão, ou seja, interferão alfa-2b peguilado para o tratamento do VHC e tratamento de desordem crónica com anticorpos PEG-modificados (A.P. Chapman, Adv.Drug Delivery Reviews (2002), 54, 531-545). Tais métodos químicos, no entanto, sofrem de um certo número de desvantagens, como por exemplo inativação da proteína ou péptido alvo devido à modificação química de certas cadeias laterais de aminoácidos, instabilidade da proteína/péptido alvo durante a reação química.

Para ultrapassar estas limitações, abordagens alternativas têm sido desenvolvidas, em primeiro lugar, através da utilização de proteínas não-convencionais ou modificadas, em segundo lugar, através de métodos alternativos para aumentar a semi-vida *in vivo*. A estabilização do fármaco protéico pode, portanto, ser efetuada através da escolha de um suporte protéico inerentemente estável e proporcionar métodos para ligar tais suportes a proteínas do plasma que ocorrem em concentrações elevadas, tais como imunoglobulinas ou albumina. A ligação às proteínas do plasma pode ser um meio eficaz para melhorar as propriedades farmacocinéticas de moléculas em geral. Mais precisamente, tem sido descrita a ligação a albumina para melhorar a semi-vida de proteínas: M.S. Dennis et al. J. Biol. Chem. 33, 2383-90, 2002), péptidos isolados com afinidade para albumina do soro. Quando ligado a moléculas Fab, foram obtidas semi-vidas comparáveis a Fab peguilada. Os ligandos peptídicos com afinidade para IgG ou albumina do soro têm sido divulgados (WO 01/45746). Cemu Bioteknik (Nygren, Wigzell, Uhlen, EP 486525 B1; US 6.267.964) descreve fusões de proteínas ou péptidos ativos de

polipéptidos de origem bacteriana, que se ligam a albumina do soro (por exemplo, Staph A). A desvantagem destas abordagens com base em péptidos consiste no facto dos péptidos terem que fazer um correto enrolamento e ser acessível para ligação à albumina do soro, quando fundida com a proteína terapêutica. Assim sendo, estes péptidos são inerentemente instáveis e possuem afinidades na gama submicromolar, em vez de ser na gama nanomolar ou subnanomolar, como é o caso com os anticorpos convencionais. Como parte de uma proteína maior, tal como uma molécula de um anticorpo convencional, a ligação destes péptidos a albumina pode ser estericamente impedida.

Uma molécula híbrida alternativa com duas unidades funcionais é baseada num anticorpo heteroespecífico. Tal híbrido consistiria numa construção de anticorpo bifuncional ou heteroespecífico com uma entidade possuindo especificidade e afinidade para o alvo, tendo a segunda entidade especificidade e afinidade para uma proteína do soro, tal como albumina. No entanto, tais construções heteroespecíficas baseadas em anticorpos convencionais ou fragmentos Fab tem várias desvantagens importantes: são moléculas complexas e grandes compostas de duas cadeias polipeptídicas (VH e VL) e, portanto, difíceis e caras de produzir em quantidades elevadas em sistemas de expressão de mamíferos. Além disso, a produção de anticorpos bifuncionais compostos por quatro cadeias (2 VH e 2 VL) têm o risco inerente de resultar em moléculas com as improdutivas combinações VH-VL e consequente perda de atividade. Várias alternativas têm sido experimentadas com resultados mistos, baseadas em derivados peptídicos de anticorpos convencionais, tais como diacorpos e scFv bifuncional. (WO0220615; WO9413804; WO9119739; W09409131) Holliger et al (Nature Biotech 15, 632-636, 1979) sugere que a ligação de um dos fragmentos de anticorpo de um

diacorpo (construção biespecífico derivado de um anticorpo convencional) de imunoglobulina de soro (IgG) pode prolongar o tempo de residência no soro de tais diacorpos, mas não é feita a sugestão de que diacorpos biespecíficos podem ser estabilizados utilizando anticorpos contra uma proteína do soro que não seja IgG sérica. Os diacorpos são conhecidos por serem inerentemente difíceis de produzir devido à rigidez da sua superfície exposta e devido a associações não produtivas entre as quatro regiões V diferentes (2 VH + 2 VL).

A ligação covalente a proteínas séricas, como descrito em, por exemplo, EP 0793506B1, US 5.612.034, 6.103.233, e US20C20003441, utilizando grupos reativos que formam ligações covalentes estáveis com uma proteína do soro ou uma célula tem a desvantagem inerente de modificação indesejada do alvo através dos grupos reativos.

As fusões a grandes proteínas e de vida longa, tais como albumina, (Syed et al, Blood 89, 3243-3252 (1997), Yen et al, PNAS 89, 1904-1908 (1992); Celltech (WO0027435)) ou fusões N-terminais de polipéptidos de albumina (Delta Biotech /HGS, US 5.380.712, US 5.766.883), ou a porção Fc de IgG (Capon et al, Nature 337, 59-5-531 (1989); Ashkenazi et al, Curr. Op. Immunol. 9, 195-200 (1997)) têm sido descritas. Estas fusões têm a desvantagem da produção ineficaz e causar reações imunológicas indesejadas.

Muyldermans, Rev. Mol. Biotechnol., 2001, 74, 277-302 descreve construções de ligação ao antigénio bivalentes e biespecíficas formadas a partir de domínios VHH.

Smith et al., Bioconjugate Chem. 2001, 12 750-756 descreve $F(ab')_2$ biespecífico com especificidade para a albumina do soro de rato que tem uma área maior abaixo da curva, em

comparação com um $F(ab')_2$ sem especificidade para a albumina.

EP 0 368 684 A1 descreve que um segundo local de ligação para um componente do soro iria prolongar a função efetora de um único domínio ligante.

Um complexo de interferão com um anticorpo monoclonal para aumentar o tempo de semi-vida do interferão foi descrito em US 5.055.289. Esta abordagem tem o risco inerente de prejudicar a atividade biológica do interferão já que o tamanho da construção aumenta os problemas de obstrução estérica.

Objetivos da presente invenção

É um objetivo da presente invenção proporcionar construções terapêuticas polipeptídicas de anticorpos heteroespecíficos que superam os problemas de anticorpos terapêuticos da técnica, ou seja, baixa semi-vida *in vivo*, falta de enrolamento, baixa expressão e pobre estabilidade. É ainda um outro objetivo da presente invenção proporcionar métodos para fornecer os anticorpos heteroespecíficos referidos.

Resumo da invenção

Uma forma de realização da presente invenção é uma construção polipeptídica compreendendo:

- pelo menos um anticorpo de domínio único dirigido contra um alvo terapêutico e/ou diagnóstico, e
- pelo menos um anticorpo de domínio único dirigido contra uma proteína do soro, tal como definido nas reivindicações.

Especificamente, a invenção refere-se a uma construção polipeptídica compreendendo:
• pelo menos um anticorpo de domínio único dirigido contra um alvo terapêutico e/ou diagnóstico, e
• pelo menos um anticorpo de domínio único dirigido contra a albumina do soro humano, que é

a) SEQ ID NO: 1, ou
b) um anticorpo humanizado *Camelidae* VHHs que é uma sequência homóloga que apresenta mais de 90% de identidade de sequência com uma sequência representada por SEQ ID NO: 1, e que é reativo de forma cruzada entre a albumina do soro de porco, humana, ratinho, hamster e de coelho.

2. A construção polipeptídica de acordo com o item 1 onde:

• o número de anticorpos de domínio único anti-alvo é, pelo menos, dois, e
• pelo menos dois anticorpos de domínio único anti-alvo não compartilham a mesma sequência, ou todos os anticorpos de domínio único anti-alvo partilham a mesma sequência.

3. Uma construção polipeptídica de acordo com o item 1 ou 2, em que pelo menos um anticorpo de domínio único, que é um anticorpo humanizado *Camelidae* VHHs e que é uma sequência homóloga que apresenta mais de 90% de identidade de sequência com uma sequência representada por SEQ ID NO: 1., é capaz de se ligar ao seu alvo com uma afinidade de mais do que 10^{-6} M.

4. Uma construção polipeptídica de acordo com qualquer um dos itens 1 a 3, em que um alvo é o TNF-alfa.

5. Uma construção polipeptídica de acordo com qualquer um dos itens 1 a 3, em que um alvo é vWF.

6. Um ácido nucléico que codifica uma construção polipeptídica de acordo com qualquer um dos itens 1 a 5.

Descrição sumária das figuras e tabelas

Figura 1 - ELISA de fagos para mostrar que nanocorpos específicos para HSA estão presentes na biblioteca, tal como descrito no Exemplo 4.

Figura 2 - Ligação de fagos que expressam ligantes de albumina a plasma em nitrocelulose, como descrito no Exemplo 8.

Figura 3 - Coloração com Coomassie de amostras de plasma em SDS-PAGE como descrito no exemplo 8.

Figura 4 - A ligação de nanocorpos purificados para albumina de ratinho como determinado por ELISA, como descrito no Exemplo 10.

Figura 5 - Local de clonagem múltipla de PAX011 para construção de nanocorpos biespecíficos como descrito no Exemplo 11.

Figura 6 - Sanduíche ELISA para mostrar a funcionalidade dos dois nanocorpos na construção biespecífica, tal como descrito no Exemplo 12.

Figura 7 - Optimização de ELISA para determinar a concentração de nanocorpos em 10% do plasma ou em 10% do sangue, tal como descrito no Exemplo 14.

Figura 8 - Farmacocinética para o nanocorpo monovalente anti-TNF-α em ratos, tal como determinado por ELISA e como descrito no Exemplo 16.

Figura 9 - Farmacocinética do nanocorpo biespecífico MSA21/TNF3E em ratos, tal como determinado por ELISA e como descrito no Exemplo 16.

Figura 10 - Farmacocinética do nanocorpo biespecífico MSA21/TNF3E em ratos, tal como determinado por ELISA com K208 em comparação com URL49, como descrito no Exemplo 16.

Figura 11 - Farmacocinética do nanocorpo biespecífico MSA24/TNF3E em ratos, tal como determinado por ELISA e como descrito no Exemplo 16.

Figura 12 - Ligação de vWF tal como determinado por ELISA, por VHH purificado, como descrito no Exemplo 23.

Figura 13 - ELISA para testar a inibição por VHH da ligação de vWF a colagénio, tal como descrito no Exemplo 24.

Figura 14 - Sandwich ELISA mostrando a funcionalidade de ambos os VHHs numa construção biespecífica, tal como descrito no exemplo 27.

Tabela 1 - Esquema de imunização de acordo com o Exemplo 1.

Tabela 2 - Resultados após um e dois ciclos de seleção em albumina de soro de rato, como descrito no exemplo 5.

Tabela 3 - Clones foram selecionados após um e dois ciclos de seleção e os extratos periplasmáticos foram preparados.

Estes clones foram analisados por ELISA quanto à ligação a albumina humana e de rato, tal como descrito no Exemplo 6.

Tabela 4 - Lista de sequências

Tabela 5 - Afinidades (koff, kon e KD) para ligantes de albumina como determinado por BIACORE, como descrito no Exemplo 13.

Tabela 6 - Resultados do ensaio LAL, para monovalentes e nanocorpos biespecíficos após a purificação sobre polimixina, como descrito no Exemplo 15.

Tabela 7 - Esquema de imunização utilizado para lama 002, de acordo com o Exemplo 17.

Tabela 8 - Unidades formadoras de placas (ufp), após um ou dois ciclos de seleção em vWF, em comparação com o PBS-caseína, como descrito no exemplo 19. Ufp vWF (antigénio) dividido por ufp caseína (uma ligação específica) = enriquecimento.

Tabela 9 - Número de inibidores versus o número de clones testados após o primeiro e o segundo ciclo de seleção como descrito no Exemplo 20.

Tabela 10 - Concentração de VHH (nM) necessária para inibir a ligação de vWF a colagénio em 50% (IC50), como descrito no Exemplo 23.

Tabela 11 - Valores de IC50 para nanocorpos biespecíficos contra a albumina e contra vWF, tal como descrito no Exemplo 28.

Tabela 12 - Homologia das fracionária entre as sequências de aminoácidos de albumina de soro VHHs anti-rato, da invenção.

Tabela 13 - Homologias fracionárias entre VHHs anti-TNF-alfa da invenção.

Tabela 14 - Homologias percentuais entre VHHs anti-IFN-gama da invenção.

Tabela 15 - Homologias fracionárias entre VHHs anti-vWF da invenção.

Descrição detalhada da invenção

A presente invenção refere-se a uma construção polipeptídica heteroespecífica como definido nas reivindicações, que compreende um ou mais anticorpos de domínio único cada um dirigido contra proteína(s) de soro de um sujeito, e um ou mais anticorpos de domínio único cada um dirigido contra molécula(s) alvo e a descoberta de que a construção tem uma semi-vida significativamente prolongada na circulação do referido sujeito em comparação com a semi-vida do anticorpo de domínio único anti-alvo quando não fazendo parte de uma tal construção.

Os anticorpos de domínio único são anticorpos cujas regiões determinantes de complementaridade são parte de um único domínio polipeptídico. Exemplos incluem, mas não estão limitados a, anticorpos de cadeia pesada, anticorpos naturalmente desprovidas de cadeias leves, anticorpos de domínio único derivados de anticorpos de cadeia-4 convencionais, anticorpos modificados e outros suportes de domínio único não derivados de anticorpos. Os anticorpos de

domínio único podem ser qualquer da técnica ou quaisquer futuros anticorpos de domínio único. Os anticorpos de domínio único podem ser derivados de qualquer espécie, incluindo, mas não limitado a ratinho, humano, camelo, lama, cabra, coelho, bovino. De acordo com um aspeto da invenção, um anticorpo de domínio único, tal como aqui utilizado é um anticorpo de domínio único que ocorre naturalmente, conhecido como anticorpo de cadeia pesada desprovida de cadeias leves. Tais anticorpos de domínio único são descritos, por exemplo, em WO 9404678. Por razões de clareza, este domínio variável derivado de um anticorpo de cadeia pesada naturalmente desprovido de cadeia leve é aqui conhecido como um VHH ou nanocorpo para distinguir de VH convencional de imunoglobulinas de quatro cadeias. Tal molécula de VHH pode ser derivada a partir de anticorpos criados em espécies de *Camelidae*, por exemplo, em camelo, dromedário, alpaca e guanaco. Outras espécies, além de *Camelidae* podem produzir anticorpos de cadeia pesada naturalmente desprovidos de cadeia leve; tais VHHs estão dentro do âmbito da invenção.

Um ou mais anticorpos de domínio único da construção polipeptídica que são dirigidos contra um alvo podem ter a mesma sequência. Alternativamente, podem não ter todos a mesma sequência. Está dentro do âmbito da invenção que uma construção polipeptídica heteroespecífica compreende anticorpos de domínio único anti-alvo em que nem todos partilham a mesma sequência, mas são dirigidos contra o mesmo alvo, ou fragmento do mesmo, um ou mais antigénios do mesmo.

De acordo com a presente invenção, são fornecidos métodos para a utilização de uma pluralidade de anticorpos de domínio único da proteína anti-alvo e/ou anti-soro para aumentar a avidez e/ou afinidade da molécula

heteroespecífica. Deste modo, as semi-vidas no soro de moléculas modificadas de acordo com a invenção podem ser aumentadas. Esta modificação vai modificar e/ou estender a janela terapêutica de uma molécula terapêutica específica. Esta flexibilidade não pode ser conseguida com métodos alternativos da técnica, como por exemplo quando se utiliza os péptidos com especificidade para as proteínas do soro, diacorpos, que são difíceis de produzir numa forma multivalente, modificações químicas (por exemplo, a peguilação, acilação).

Um ou mais anticorpos de domínio único da construção polipeptídica que são dirigidos contra uma proteína de soro podem ter a mesma sequência. Alternativamente, podem não ter todos a mesma sequência. Está dentro do âmbito da invenção que uma construção polipeptídica heteroespecífica compreende anticorpos de domínio único da proteína anti-soro, que não partilham todos da mesma sequência, mas os quais são dirigidos contra a proteína de soro, ou um seu fragmento, um ou mais seus antigénios.

Numa outra forma de realização, um ou mais anticorpos de domínio único anti-alvo da construção polipeptídica podem ser dirigidos para mais do que um alvo (por exemplo, vWF e colagénio). Da mesma forma, os anticorpos de domínio único da proteína anti-soro da construção polipeptídica podem ser dirigidos contra mais do que uma proteína de soro (por exemplo, albumina do soro e fibrinogénio).

Os VHHs, de acordo com a presente invenção, e tal como é conhecido para o perito na especialidade, são domínios variáveis da cadeia pesada derivados de imunoglobulinas naturalmente desprovidas de cadeias leves, tais como aquelas derivadas a partir de Camelídeos, tal como descrito em WO9404678 (e referido a seguir como domínios VHH ou

nanocorpos). As moléculas VHH são cerca de 10x menores do que as moléculas de IgG. São polipéptidos individuais e muito estáveis, resistentes a condições extremas de pH e temperatura. Além disso, são resistentes à ação de proteases que não é o caso para os anticorpos convencionais. Além disso, a expressão *in vivo* de VHHs tem um elevado rendimento e são VHHs funcionais com um adequado enrolamento. Adicionalmente, os anticorpos gerados em Camelídeos irão reconhecer outros epítopos que não são os que foram reconhecidos por anticorpos gerados *in vitro* através da utilização de bibliotecas de anticorpos ou através de imunização de outros mamíferos para além de Camelídeos (WO 9749805). Como tal, a VHH anti-albumina pode interagir de uma forma mais eficiente com a albumina do soro, que é conhecida por ser uma proteína transportadora. Como proteína transportadora alguns dos epítopos de albumina de soro pode ser inacessível para proteínas de ligação, péptidos e pequenos compostos químicos. Como VHHs são conhecidos por se ligarem a epítopos "incomums" ou não convencionais, tais como cavidades (WO9749805), a afinidade de tais VHHs para a albumina em circulação pode ser aumentada.

A presente invenção também se relaciona com a descoberta de que uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais VHHs dirigidos contra uma ou mais proteínas de soro de um sujeito, e uma ou mais VHHs dirigidos contra um ou mais moléculas alvo do referido sujeito tem, surpreendentemente, uma semi-vida significativamente prolongada na circulação do referido sujeito, em comparação com a semi-vida do VHH anti-alvo, quando não façam parte da referida construção. Adicionalmente, tal semi-vida prolongada encontra-se na gama de vários dias devido à elevada afinidade de VHH de albumina anti-soro em comparação de várias horas quando são

utilizados péptidos de baixa afinidade, específicos para a albumina (Dennis et al, JBC, 277, 35035). O prolongamento da semi-vida é demonstrado pelos presentes inventores, por exemplo, no Exemplo 16, e por o polipéptido representado pela SEQ ID NO: 5. Adicionalmente, constatou-se que a referida construção exibia as mesmas propriedades favoráveis de VHHs, tais como, a alta estabilidade que permanece intacta em ratinhos durante pelo menos 19 dias (Exemplo 16), a resistência de pH extremo, a estabilidade a elevada temperatura e elevada afinidade ao alvo.

Um alvo de acordo com a invenção é uma qualquer substância biológica capaz de se ligar à construção polipeptidíca heteroespecífica da invenção. Os alvos podem ser, por exemplo, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, ácidos oligonucleicos, sacáridos, polissacáridos, glicoproteínas. Exemplos incluem, mas não estão limitados a, alvos terapêuticos, alvos de diagnóstico, recetores, ligandos recetores, proteínas virais de revestimento, proteínas do sistema imunitário, hormonas, enzimas, antigénios, proteínas de sinalização celular, ou um seu fragmento. Os alvos podem ser de proteína nativa ou um seu fragmento, uma sequência homóloga da mesma, uma parte funcional desta, ou uma parte funcional de uma sequência homóloga.

As propriedades de anticorpos de domínio único, em particular os VHHs, comparam-se favoravelmente com os dos anticorpos derivados a partir de fontes, tais como o rato, ovelha, cabra, coelho, etc. (ou seja, os anticorpos tradicionais), e derivados humanizados dos mesmos. Os anticorpos tradicionais não são estáveis à temperatura ambiente, e têm que ser refrigerados para a preparação e armazenamento, requerendo equipamento de laboratório refrigerado, armazenamento e transporte, o que contribui para o tempo e a despesa. A refrigeração por vezes, não é

viável em países em desenvolvimento. Além disso, a fabricação ou produção em pequena escala dos referidos anticorpos é cara porque os sistemas celulares de mamíferos necessários para a expressão de anticorpos intactos e ativos requerem elevados níveis de suporte, em termos de tempo e equipamento, e os rendimentos são muito baixos. Adicionalmente, os anticorpos tradicionais têm uma atividade de ligação que depende do pH, e, portanto, não são adequados para utilização em ambientes fora do intervalo do pH fisiológico normal, tais como, por exemplo, no tratamento de hemorragia gástrica, cirurgia gástrica. Além disso, os anticorpos tradicionais são instáveis a pH baixo ou elevado e, portanto, não são adequados para a administração oral. No entanto, demonstrou-se que VHHs resistem a condições severas, tais como o pH extremo, reagentes desnaturantes e temperaturas elevadas (Ewerf S et al, Biochemistry 2002 Mar 19;41(11):3628-36), tornando-os assim apropriados para a entrega através administração por via oral. Além disso, os anticorpos tradicionais têm uma atividade de ligação que depende da temperatura e, portanto, não são adequados para utilização em ensaios ou kits realizados a temperaturas fora das gamas da temperatura biologicamente ativa (por exemplo, 37±20°C).

Adicionalmente, os VHHs são mais solúveis, o que significa que podem ser armazenados e/ou administrados em concentrações mais elevadas em comparação com os anticorpos convencionais. Os polipéptidos da presente invenção também retêm atividade de ligação a um pH e temperatura fora de gamas fisiológicas normais, o que significa que podem ser úteis em situações de pH e temperatura extremas, que requerem uma modulação da agregação mediada por plaquetas, tal como, em cirurgia gástrica, controlo da hemorragia gástrica, ensaios realizados à temperatura ambiente, etc. Os polipéptidos da presente invenção também exibem uma

estabilidade prolongada a valores extremos de pH, o que significa que seria adequado para a entrega por administração oral. Os polipéptidos da presente invenção podem ser produzidos de forma eficaz em termos de custos por meio de fermentação, em convenientes organismos hospedeiros recombinantes, tais como *Escherichia coli* e levedura; ao contrário de anticorpos convencionais, que também exigem caras instalações de cultura de células de mamíferos, os níveis alcançáveis de expressão são elevados. Exemplos de rendimentos dos polipéptidos da presente invenção são de 1 a 10 mg/mL (*E. coli*) e de até 1 g/L (levedura). Os polipéptidos da presente invenção também apresentam uma elevada afinidade de ligação para uma ampla gama de diferentes tipos de antigénios e capacidade para se ligarem a epítopos reconhecidos pelos anticorpos não convencionais; por exemplo, eles exibem longas estruturas em laço com base em CDR com potencial para penetrar nas cavidades e exibem inibição da função enzimática. Adicionalmente, uma vez que muitas vezes a ligação ocorre apenas através do laço CDR3, prevê-se que os péptidos derivados de CDR3 podem ser usados terapeuticamente (Desmyter et al., J Biol Chem, 2001, 276:26285-90). Os polipéptidos da invenção também são capazes de reter a capacidade de ligação completa, como proteína de fusão com uma enzima ou toxina.

A presente invenção refere-se também a uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo uma ou mais VHHs, cada dirigido contra um ou mais proteínas de soro de um sujeito, e uma ou mais VHH cada dirigido contra uma ou mais moléculas alvo, em que os VHHs pertencem à classe tradicional de anticorpos de único domínio de cadeia pesada de *Camelidae*. A presente invenção refere-se também a uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo uma

ou mais VHH cada um dirigido contra uma ou mais proteínas do soro de um sujeito, e uma ou mais VHH cada um dirigido contra uma ou mais moléculas alvo, em que os VHHs pertencem a uma classe de anticorpos de domínio único de cadeia pesada de *Camelidae*, que têm sequências semelhantes às humanas. Uma sequência de VHH, representada pela SEQ ID NO: 12 que se liga ao TNF-alfa e um segundo VHH que se liga a albumina do rato, pertence a esta classe de péptidos de VHH. Como tal, os péptidos que pertencem a esta classe mostram uma elevada homologia da sequência de aminoácidos para regiões estruturais VH humanas e os referidos péptidos podem ser administrados a doentes diretamente sem expetativa de uma resposta imunitária indesejável, do mesmo, e sem a carga adicional de humanização.

A classe de tipo humano de anticorpos de domínio único *Camelidae* representada pelas SEQ ID No 1, 3 e 4 foi descrita em WO03035694 e contém os resíduos hidrófobos FR2 tipicamente encontrados nos anticorpos convencionais de origem humana ou de outras espécies, mas compensando esta perda de hidrofilicidade por outras substituições na posição 103 que substitui o resíduo conservado triptofano, presente em VH de anticorpos de cadeia dupla. Como tal, os péptidos pertencentes a estas duas classes mostram uma elevada homologia das sequências de aminoácidos para regiões estruturais VH humanas e os referidos péptidos podem ser administrados a um ser humano diretamente sem expetativa de uma resposta imunitária indesejável e sem a carga adicional de humanização.

Portanto, um aspeto da presente invenção permite a administração direta a um paciente em necessidade de uma construção polipeptídica compreendendo um polipéptido de albumina anti-soro, em que os anticorpos de domínio único

pertencem à classe de VHH humanizado e compreendem uma sequência representada pela SEQ ID NO: 1.

Um sujeito como aqui utilizado é um qualquer mamífero, tendo um sistema circulatório no qual o fluido compreende as proteínas do soro. Exemplos de sistema circulatório incluem sistemas sanguíneos e linfáticos. Exemplos de animais incluem, mas não estão limitados a, coelhos, seres humanos, cabras, murganhos, ratos, vacas, bezerros, camelos, lamas, macacos, burros, porco-da-índia, aves, ovelhas, cães, gatos, cavalos, etc.

Uma forma de realização da presente invenção consiste numa construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo pelo menos um anticorpo de domínio único dirigido contra um alvo terapêutico e/ou de diagnóstico, e pelo menos um anticorpo de domínio único dirigido contra cada uma ou mais proteínas ou polipéptidos do soro, como definidos nas reivindicações. Como já mencionado, os anticorpos de domínio único anti-alvo podem ter a mesma sequência. Alternativamente, pelo menos, dois anticorpos de domínio único anti-alvo podem ter diferentes sequências, mas são dirigidos contra o mesmo epítopo ou epítopos diferentes no mesmo alvo, seus fragmentos ou seu antigénio. Da mesma forma, os anticorpos de domínio único da proteína anti-soro podem ter a mesma sequência. Alternativamente, pelo menos, dois anticorpos de domínio único da proteína anti-soro podem ter diferentes sequências, mas são dirigidos contra o mesmo epítopo ou epítopos diferentes na mesma proteína de soro, seus fragmentos, ou seu antigénio.

Numa outra forma de realização da presente invenção, onde mais do que um anticorpo de domínio único anti-alvo está presente na construção polipeptídica heteroespecífica, cada anticorpo de domínio único anti-alvo pode ser dirigido a um

alvo diferente (por exemplo, um para o vWF e um para o colagénio). Da mesma forma, quando mais do que um anticorpo de domínio único de uma proteína anti-soro está presente, cada anticorpo de domínio único anti-soro pode ser dirigido a uma proteína de soro diferente (por exemplo, um para a albumina do soro e um para o fibrinogénio).

Uma forma de realização da invenção, é um polipéptido heteroespecífico, em que um anticorpo de domínio único da proteína anti-soro corresponde a uma sequência representada por SEQ ID NO: 1.

As construções reveladas aqui retêm as propriedades vantajosas dos anticorpos de domínio único (por exemplo, VHHs) e têm uma vida prolongada na circulação de um indivíduo. Assim, estas construções são capazes de circular no soro do sujeito durante vários dias, reduzindo a frequência do tratamento, os inconvenientes para o sujeito e resulta numa diminuição dos custos de tratamento. Adicionalmente, é um aspeto da invenção que a semi-vida das construções polipeptídicas heteroespecíficas possa ser controlada pelo número de anticorpos de domínio único da proteína anti-soro presentes na construção. Uma semi-vida controlável é desejável em várias circunstâncias, por exemplo, na aplicação de uma dose programada de uma construção polipeptídica heteroespecífica terapêutica ou para obter um efeito terapêutico desejado.

De acordo com um aspeto da invenção, uma construção polipeptídica heteroespecífica pode ser uma sequência homóloga de uma construção polipeptídica heteroespecífica de comprimento completo. De acordo com um outro aspeto da invenção, uma construção polipeptídica heteroespecífica pode ser uma porção funcional de uma construção polipeptídica heteroespecífica de comprimento total. De

acordo com um outro aspeto da invenção, uma construção polipeptídica heteroespecífica pode ser uma sequência homóloga de uma construção polipeptídica heteroespecífica de comprimento completo. De acordo com um outro aspeto da invenção, uma construção polipeptídica heteroespecífica pode ser uma parte funcional de uma sequência homóloga de uma construção polipeptídica heteroespecífica de comprimento completo. De acordo com um aspeto da invenção, uma construção polipeptídica heteroespecífica pode compreender uma sequência de uma construção polipeptídica heteroespecífica.

De acordo com um aspeto da invenção, um anticorpo de domínio único utilizado para formar uma construção polipeptídica heteroespecífica pode ser um anticorpo completo de domínio único (por exemplo, um VHH) ou uma sequência homóloga do mesmo. De acordo com um outro aspeto da invenção, um anticorpo de domínio único utilizado para formar a construção polipeptídica heteroespecífica pode ser uma porção funcional de um anticorpo de domínio único completo. De acordo com um outro aspeto da invenção, um anticorpo de domínio único utilizado para formar a construção polipeptídica heteroespecífica pode ser uma sequência homóloga de um anticorpo de domínio único completo. De acordo com um outro aspeto da invenção, um anticorpo de domínio único utilizado para formar a construção polipeptídica heteroespecífica pode ser uma parte funcional de uma sequência homóloga de um anticorpo de domínio único completo.

De acordo com outro aspeto da invenção, uma construção polipeptídica heteroespecífica pode ser uma sequência homóloga da sequência parental. De acordo com um outro aspeto da invenção, uma construção polipeptídica heteroespecífica pode ser uma porção funcional da sequência

parental. De acordo com um outro aspeto da invenção, uma construção polipeptídica heteroespecífica pode ser uma parte funcional de uma sequência homóloga da sequência parental.

Tal como aqui utilizado, uma sequência homóloga da presente invenção podem incluir adições, deleções ou substituições de um ou mais aminoácidos, que não alterem substancialmente as características funcionais dos polipéptidos da invenção. O número de deleções ou substituições de aminoácidos é, de preferência até 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 ou 70 aminoácidos.

A sequência homóloga da presente invenção pode incluir um anticorpo de domínio único da invenção, que foi humanizado.

Por humanizado entende-se mutado, de modo que a imunogenicidade após a administração em pacientes humanos é menor ou inexistente. Humanizar um anticorpo de domínio único, de acordo com a presente invenção, compreende um passo de substituição de um ou mais aminoácidos, pela sua contraparte humana, como encontrada na sequência de consenso humana, sem que polipéptido perca o seu carácter típico, isto é, a humanização não afeta significativamente a capacidade de ligação do antigénio ao polipéptido resultante. Tais métodos são conhecidos pelos peritos na especialidade. Uma técnica de humanização aplicada a VHHs de *Camelidae* pode também ser realizada por um método que compreende a substituição de qualquer um dos seguintes resíduos, quer isoladamente ou em combinação: alguns VHH contém resíduos típicos de *Camelidae* marcados na posição

37, 44, 45 e 47 com características hidrófilas. A substituição dos resíduos hidrofílicos por resíduos hidrófobos humanos nas posições 44 e 45 (E44G e R45L) não tem um efeito na ligação e/ou inibição. Adicional humanização pode ser necessária, por substituição dos resíduos de FR 1, tal como nas posições 1, 5, 28 e 30; FR3, tal como nas posições 74, 75, 76, 83, 84, 93 e 94; e FR4, tal como nas posições 103, 104, 108 e 111 (toda a numeração de acordo com Kabat).

Uma forma de realização é um método para humanizar um VHH que compreende os passos de substituição de qualquer um dos seguintes resíduos, quer isoladamente ou em combinação:

FR1 - posições 1, 5, 28 e 30,
o aminoácido marcado na posição 44 e 45 em FR2,
FR3 - resíduos 74, 75, 76, 83, 84, 93 e 94,
e as posições 103, 104, 108 e 111 em FR4;

(numeração de acordo com a numeração Kabat).

Algumas sequências de VHH *Camelidae* exibem uma elevada homologia a regiões de estrutura VH humano e, portanto, o referido VHH pode ser administrado diretamente a pacientes, sem expectativa de surgimento de uma resposta imune, e sem a carga adicional de humanização. Assim sendo, um aspeto da presente invenção consiste em permitir a formação de uma construção polipeptídica heteroespecífica sem humanização da região VHH, quando o referido VHH exibe uma elevada homologia com as regiões estruturais VH humano.

A sequência homóloga da presente invenção pode ser uma sequência da invenção, derivada de uma outra espécie, tal como, por exemplo, camelo, lama, dromedário, alpaca, guanaco, etc.

Onde a sequência homóloga indica a identidade da sequência, significa uma sequência que apresenta uma elevada identidade de sequência (superior a 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 98% de identidade de sequência) com um anticorpo de domínio único da invenção, e é de preferência caracterizada por propriedades semelhantes da sequência parental, nomeadamente, a afinidade, a referida identidade calculada utilizando métodos conhecidos.

Uma sequência homóloga de acordo com a presente invenção pode referir-se a sequências de nucleótidos de mais do que 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 ou 1000 nucleótidos capazes de hibridizar para o complemento reverso da sequência de nucleótidos, capazes de codificar uma sequência nativa sob rigorosas condições de hibridação (tais como as descritas por SAMBROOK et al., Molecular Cloning, Laboratory Manuel, Cold Spring Harbor Laboratory press, New York).

Tal como aqui utilizado, uma porção funcional refere-se a um anticorpo de domínio único de comprimento suficiente, de tal modo que a interação de interesse seja mantida com afinidade de 1 x 10^{-6}M ou melhor.

Alternativamente, uma porção funcional de um anticorpo de domínio único da invenção compreende uma deleção parcial da sequência completa de aminoácidos e ainda mantém o(s) local de ligação e o(s) domínio(s) da proteína necessários para a ligação e interação com o alvo ou a proteína de soro.

Tal como aqui utilizado, uma parte funcional de um anticorpo de domínio único da invenção refere-se a menos do que 100% da sequência (por exemplo, 99%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, etc.), mas compreende 5 ou mais aminoácidos, ou 15 ou mais nucleótidos.

Uma porção de um anticorpo de domínio único da invenção refere-se a menos do que 100% da sequência (por exemplo, 99%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, etc.), mas compreende cinco ou mais aminoácidos ou 15 ou mais nucleótidos.

Os alvos como aqui mencionados, tais como TNF-alfa, recetor de IFN-gama, proteínas do soro (por exemplo, albumina do soro, imunoglobulinas do soro, proteína de ligação a tiroxina, transferrina, fibrinogénio) e IFN-gama podem ser fragmentos dos referidos alvos. Assim, um alvo é também um fragmento do referido alvo, capaz de induzir uma resposta imunológica. Um alvo é também um fragmento do referido alvo, capaz de se ligar a um anticorpo de domínio único criado contra o alvo de comprimento completo.

Um fragmento, tal como aqui utilizado refere-se a menos do que 100% da sequência (por exemplo, 99%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% etc.), mas compreende 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 ou mais aminoácidos. Um fragmento tem um comprimento suficiente de modo que a interação de interesse seja mantida com uma afinidade de 1 x 10^{-6}M ou melhor.

Um fragmento, tal como aqui utilizado refere-se também às inserções opcionais, supressões e substituições de um ou mais aminoácidos, que não alteram substancialmente a capacidade do alvo para se ligar a um anticorpo de domínio único criado contra o alvo do tipo selvagem. O número de inserções de aminoácidos deleções ou substituições é de preferência até 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 7, 8, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 51, 58,

59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 ou 70 aminoácidos.

A proteína do soro é albumina do soro humano.

Um anticorpo de domínio único dirigido contra um alvo significa um anticorpo de domínio único que é capaz de se ligar ao seu alvo com uma afinidade de mais do que 10^{-6}M.

As construções polipeptídicas heteroespecíficas aqui descritas, podem ser realizadas pelos peritos na especialidade de acordo com métodos conhecidos na área técnica ou um qualquer método futuro. Por exemplo, os VHHs podem ser obtidos utilizando métodos conhecidos na área técnica, tais como por imunização de um camelo e obtenção de hibridomas do mesmo, ou por clonagem de uma biblioteca de anticorpos de domínio único utilizando técnicas de biologia molecular conhecidas na técnica e subsequente seleção utilizando exibição em fagos.

O anticorpo de domínio único da proteína anti-soro pode ser dirigido contra um polipéptido de uma proteína do soro ou uma proteína inteira. O anticorpo de domínio único anti-alvo pode ser dirigido contra um polipéptido do referido alvo, de todo o alvo. Os métodos para o rastreamento de uma proteína de polipéptidos imunogénicos são bem conhecidos na área técnica.

Os anticorpos de domínio único podem ser ligados, utilizando métodos conhecidos na área técnica ou num qualquer método futuro. Por exemplo, podem ser fundidos por reticulação química, por reação de resíduos de aminoácidos com um agente de derivatização orgânico, tal como descrito por Blattler et al., Biochemistry 24,1517-1524; EP294703. Alternativamente, o anticorpo de domínio único pode ser

fundido geneticamente ao nível do ADN, ou seja, uma construção polinucleotídica formada, a qual codifica a construção polipeptídica completa, compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-alvo e um ou mais anticorpos de domínio único da proteína anti-soro. Um método para a produção de construções polipeptídicas VHH bivalentes ou multivalentes encontra-se descrito no pedido de patente PCT WO 96/34103. Uma forma de unir vários anticorpos de domínio único através da via genética, ligando as sequências codificantes do anticorpo de domínio único, quer diretamente ou através de um ligante peptídico. Por exemplo, a extremidade do terminal C do primeiro anticorpo de domínio único pode ser ligada à extremidade do terminal N do seguinte anticorpo de domínio único. Este modo de ligação pode ser estendido para ligar adicionais anticorpos de domínio único para a construção e produção de construções funcionais, tri-, tetra-, etc.

Um aspeto é a administração de construções polipeptídicas heteroespecíficas de acordo com a invenção, que evita a necessidade de injeção. Na terapêutica à base de anticorpos convencionais, estes têm um grande potencial como fármacos, porque têm uma especificidade apurada para o seu alvo e uma baixa toxicidade inerente, no entanto, têm uma desvantagem importante: são moléculas grandes, complexas e, portanto, relativamente instáveis, e são sensíveis ao fracionamento por proteases. Tal significa que as fármacos de anticorpos convencionais não podem ser administrados por via oral, sublingual, tópica, nasal, vaginal, retal ou por inalação porque não são resistentes ao pH baixo nestes locais, a ação de proteases nestes locais e no sangue e/ou devido ao seu grande tamanho. Têm de ser administrados por injeção (intravenosa, subcutânea, etc.), para superar alguns destes problemas. A administração por injeção requer formação especializada, de modo a utilizar corretamente uma seringa

ou agulha hipodérmica e com segurança. Além disso, exige equipamento estéril, uma formulação líquida do polipéptido terapêutico, frasco para embalagem do referido polipéptido numa forma estéril e estável e, no sujeito, um local adequado para entrada da agulha. Adicionalmente, os indivíduos têm geralmente estresse físico e psicológico antes e depois de receber uma injeção. Um aspeto da presente invenção ultrapassa estes problemas da técnica anterior, fornecendo as construções polipeptídicas heteroespecíficas da presente invenção. As referidas construções são suficientemente pequenas, resistentes e estáveis para serem entregues por via oral, sublingual, tópica, nasal, vaginal, retal ou por inalação sem perda substancial de atividade. As construções polipeptídicas heteroespecíficas da presente invenção evitam a necessidade de injeções, não sendo apenas economias de custo/tempo, mas também são mais convenientes e mais confortáveis para o sujeito.

Uma forma de realização é uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo pelo menos um anticorpo de domínio único dirigido contra um alvo para utilização no tratamento, prevenção e/ou alívio dos sintomas de distúrbios sensíveis à modulação por um composto terapêutico anti-alvo, que é capaz de passar através ambiente gástrico, sem ser inativado.

Como é conhecido pelos peritos na especialidade, uma vez na posse da referida construção polipeptídica, a tecnologia de formulação pode ser aplicada para libertar uma quantidade máxima de VHHs na posição correta (no estômago, cólon, etc.). Este método de administração é importante para tratar, prevenir e/ou aliviar os sintomas de desordem cujos alvos que estão localizados no sistema intestinal.

Um aspeto é um método para tratar, prevenir e/ou aliviar os sintomas de uma perturbação susceptível a modulação por um composto terapêutico que é capaz de passar através do ambiente gástrico, sem ser inativado, por administração oral a um sujeito de uma construção polipeptídica heteroespecífica, que compreende um ou mais anticorpos de domínio único específicos para o antigénio relacionado com o distúrbio.

Uma outra forma de realização é a utilização de uma construção polipeptídica heteroespecífica, tal como aqui divulgado, para a preparação de um medicamento para o tratamento, prevenção e/ou alivio dos sintomas de distúrbios sensíveis à modulação por um composto terapêutico anti-alvo, que é capaz de passar através do meio gástrico sem ser inativado.

Um aspeto é um método para a entrega de um composto terapêutico anti-alvo para o sistema intestinal, sem ser inativado, por administração oral a um sujeito de uma construção polipeptídica heteroespecífica, compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único dirigidos contra o referido alvo.

Um aspeto é um método para a entrega de um composto terapêutico anti-alvo para a corrente sanguínea de um paciente, sem ser inativado, por administração oral a um sujeito de uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único dirigidos contra o referido alvo.

Uma outra forma de realização é uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo pelo menos um anticorpo de domínio único dirigido contra um alvo, aqui para utilização no tratamento, prevenção e/ou alivio dos

sintomas de distúrbios sensíveis à modulação por um composto terapêutico anti-alvo entregue ao trato vaginal e/ou retal.

Num exemplo não limitativo, uma formulação de acordo com a invenção compreende uma construção polipeptídica heteroespecífica, tal como aqui divulgado, compreendendo um ou mais VHHs dirigidos contra um ou mais alvos, na forma de um gel, creme, supositório, filme, ou na forma de uma esponja ou de um anel vaginal que liberta lentamente o ingrediente ativo ao longo do tempo (estas formulações são descritas no documento EP 707473, EP 684814, US 5629001).

Um aspeto consiste num método para tratar, prevenir e/ou aliviar os sintomas dos distúrbios sensíveis à modulação por um composto terapêutico ao trato vaginal e/ou retal, por administração a um sujeito via vaginal e/ou retal de uma construção polipeptídica heteroespecífica que compreende um ou mais anticorpos de domínio único específicos para o antigénio relacionado com o distúrbio.

Uma outra forma de realização é a utilização de uma construção polipeptídica heteroespecífica, tal como aqui divulgado, para a preparação de um medicamento para tratar, prevenir e/ou aliviar os sintomas dos distúrbios sensíveis à modulação por um composto terapêutico anti-alvo entregue ao trato vaginal e/ou retal, sem estar inativo.

Um aspeto consiste num método para a entrega de um composto terapêutico anti-alvo no trato vaginal e/ou retal, sem ser inativado, por meio da administração ao trato vaginal e/ou retal de um sujeito de uma construção polipeptídica heteroespecífica, compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único, contra o referido alvo.

Um aspeto consiste num método para a entrega de um composto terapêutico anti-alvo na corrente sanguínea de um paciente, sem ser inativado, por meio da administração ao trato vaginal e/ou retal de um sujeito de uma construção polipeptídica heteroespecífica, compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único dirigido contra o referido alvo.

Uma outra forma de realização consiste numa construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo pelo menos um anticorpo de domínio único dirigido contra um alvo que compreende pelo menos um anticorpo de domínio único dirigido contra um alvo, para utilização no tratamento, prevenção e/ou alivio dos sintomas de distúrbios sensíveis à modulação por um composto terapêutico anti-alvo, entregue ao nariz, trato respiratório superior e/ou pulmão.

Num exemplo não limitativo, uma formulação de acordo com a invenção, compreende uma construção polipeptídica heteroespecífica como aqui divulgado, dirigida contra um ou mais alvos na forma de um pulverizador nasal (por exemplo, um aerossol) ou inalador. Uma vez que a construção é pequena, pode atingir o seu alvo muito mais eficaz do que as moléculas terapêuticas de IgG.

Um aspeto consiste num método para tratar, prevenir e/ou aliviar os sintomas dos distúrbios sensíveis à modulação por um composto terapêutico entregue no trato respiratório superior e no pulmão, por administração a um indivíduo de uma construção polipeptídica heteroespecífica, tal como aqui divulgada, em que um ou mais anticorpos de domínio único são específicos para um antigénio relacionado com a doença, por inalação através da boca ou do nariz.

Um outro aspeto é uma composição de VHH dispersável, em particular, composições de VHH em pó seco dispersáveis, tais como aquelas descritas em US 6514496. Estas composições de pó seco compreendem uma pluralidade de partículas secas com um tamanho médio de partícula na gama de 0,4-10 mm. Tais pós são susceptíveis de serem prontamente dispersos num dispositivo de inalação. O VHH é particularmente adequado para tal composição, como um material liofilizado que pode ser facilmente dissolvido (no pulmão subsequentemente a ser inalado), devido à sua elevada capacidade de solubilização (Muyldermans, S., Reviews in Molecular Biotechnology, 74, 277-303, (2001)). Em alternativa, estas formulações liofilizadas de VHH podem ser reconstituídas com um diluente para produzir uma formulação estável reconstituída apropriada para a administração subcutânea. Por exemplo, foram preparadas formulações do anticorpo anti-IgE (Exemplo 1, US 6267958, EP 841946)que são úteis para o tratamento da asma alérgica.

Uma outra forma de realização é a utilização de um construção polipeptídica heteroespecífica tal como aqui divulgada, para a preparação de um medicamento para tratar, prevenir e/ou aliviar os sintomas dos distúrbios sensíveis à modulação por um composto terapêutico anti-alvo entregue ao nariz, trato respiratório superior e/ou pulmão, sem ser inativado.

Um aspeto consiste num método para a entrega de um composto terapêutico anti-alvo para o nariz, trato respiratório superior e o pulmão, por administração ao nariz, trato respiratório superior e/ou pulmão de um sujeito, de uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único dirigidos contra o referido alvo.

Um aspeto consiste num método para a entrega de um composto terapêutico anti-alvo para o nariz, trato respiratório superior e/o pulmões sem ser inativado, por meio da administração ao nariz, trato respiratório superior e/ou pulmão de um sujeito, de uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único dirigidos contra o referido alvo.

Um aspeto consiste num método para a entrega de um composto terapêutico anti-alvo para a corrente sanguínea de um paciente, sem ser inativado, por administração ao nariz, trato respiratório superior e/ou do pulmão de um sujeito, de uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo uma ou mais anticorpos de domínio único contra o referido alvo.

Uma forma de realização consiste numa construção polipeptídica heteroespecífica, tal como aqui descrita para utilização no tratamento, prevenção e/ou alivio nos sintomas de distúrbios sensíveis à modulação por um composto terapêutico anti-alvo, entregue à mucosa intestinal, em que a referida desordem aumenta a permeabilidade da mucosa intestinal. Devido ao seu pequeno tamanho, uma construção polipeptídica heteroespecífica, tal como aqui descrita, pode passar através da mucosa intestinal e atingir a corrente sanguínea de forma mais eficaz em indivíduos que sofrem de distúrbios que causam um aumento da permeabilidade da mucosa intestinal.

Um aspeto consiste num método para tratar, prevenir e/ou aliviar os sintomas dos distúrbios sensíveis à modulação por um composto terapêutico anti-alvo entregue à mucosa intestinal, em que a referida desordem aumenta a permeabilidade da mucosa intestinal, por administração oral

a um sujeito de uma construção polipeptídica heteroespecífica, tal como aqui divulgada.

Este processo pode ser ainda mais melhorado por um aspeto adicional da presente invenção - a utilização de transportadores de transporte ativo. Neste aspeto da invenção, o VHH é fundido com um veículo que aumenta a transferência através da parede intestinal para a corrente sanguínea. Num exemplo não limitativo, este "transportador" é um segundo VHH que está fundido com o VHH terapêutico. Tais construções de fusão são efetuadas utilizando métodos conhecidos na técnica. O "transportador" VHH liga-se especificamente a um recetor da parede intestinal que induz uma transferência ativa através da parede.

Uma outra forma de realização é a utilização de um construção polipeptídica heteroespecífica, tal como aqui divulgada, para a preparação de um medicamento para tratar, prevenir e/ou aliviar os sintomas dos distúrbios sensíveis à modulação por um composto terapêutico anti-alvo entregue à mucosa intestinal, em que a referida desordem aumenta a permeabilidade da mucosa intestinal.

Um aspeto consiste num método para a entrega de um composto terapêutico anti-alvo para a mucosa intestinal sem ser inativado, por meio da administração por via oral a um sujeito de uma construção polipeptídica heteroespecífica da invenção.

Um aspeto consiste num método para a entrega de um composto terapêutico anti-alvo para a corrente sanguínea de um paciente, sem ser inativado, por meio da administração por via oral a um sujeito, de uma construção polipeptídica heteroespecífica da invenção.

Este processo pode ser ainda melhorado por um aspeto adicional da presente invenção - a utilização de transportadores de transporte ativo. Neste aspeto da invenção, uma construção polipeptídica heteroespecífica tal como aqui descrita, está fundida com um transportador que aumenta a transferência através da parede intestinal para a corrente sanguínea. Num exemplo não limitativo, este "transportador" é um VHH que está fundido com o referido polipéptido. Tais construções de fusão são realizadas utilizando métodos conhecidos na técnica. O "transportador" VHH liga-se especificamente a um recetor na parede intestinal que induz uma transferência ativa através da parede.

Uma forma de realização consiste numa construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo pelo menos um anticorpo de domínio único dirigido contra um alvo para utilização no tratamento, prevenção e/ou alivio dos sintomas de distúrbios sensíveis à modulação por um composto terapêutico anti-alvo que é capaz de passar através dos tecidos de forma eficaz. A formulação da referida construção polipeptídica, tal como aqui divulgado, é, por exemplo, um comprimido, pulverização, gota colocada debaixo da língua e adsorvida através das membranas mucosas na rede capilar debaixo da língua.

Um aspeto consiste num método para tratar, prevenir e/ou aliviar os sintomas dos distúrbios sensíveis à modulação de um composto terapêutico, que é capaz de passar através dos tecidos por debaixo da língua de forma eficaz, por administração via sublingual, a um sujeito, de um VHH específico para um antigénio relacionado com a desordem.

Uma outra forma de realização consiste na utilização de um construção polipeptídica heteroespecífica, tal como aqui

divulgada, para a preparação de um medicamento para tratar, prevenir e/ou aliviar os sintomas dos distúrbios sensíveis à modulação por um composto terapêutico anti-alvo, que é capaz de passar através dos tecidos debaixo da língua.

Um aspeto é um método para a entrega de um composto terapêutico anti-alvo para os tecidos por debaixo da língua, sem ser inativado, por meio da administração por via oral a um sujeito de uma construção polipeptídica heteroespecífica, compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único dirigidos contra o referido alvo.

Um aspeto consiste num método para a entrega de um composto terapêutico anti-alvo para a corrente sanguínea de um paciente, sem ser inativado, por meio da administração por via oral, a um sujeito, de uma construção polipeptídica heteroespecífica, compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único dirigidos contra o referido alvo.

Uma forma de realização consiste numa construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo pelo menos um anticorpo de domínio único para utilização no tratamento, prevenção e/ou alivio dos sintomas de distúrbios sensíveis à modulação por um composto terapêutico anti-alvo que é capaz de passar através da pele de forma eficaz. A formulação da referida construção polipeptídica é, por exemplo, um creme, película, spray, gota, adesivo, colocada sobre a pele, atravessando-a.

Um aspeto é um método para tratar, prevenir e/ou aliviar os sintomas dos distúrbios sensíveis à modulação de um composto terapêutico que é capaz de passar através da pele de forma eficaz, por administração tópica, a um indivíduo, de uma construção polipeptídica heteroespecífica, como aqui revelada, compreendendo um ou mais anticorpos de domínio

único específicos para um antigénio relacionado com o distúrbio.

Um outro aspeto é a utilização de uma construção polipeptídica heteroespecífica, como aqui revelada, como uma composição oftálmica tópica para o tratamento de distúrbio ocular, tais como doenças alérgicas, a qual compreende a administração tópica de uma composição oftálmica que compreende a construção polipeptídica, tal como aqui divulgada, a qual compreende um ou mais VHH anti-IgE (Exemplo 1, Exemplo 2).

Uma outra forma de realização é a utilização de um construção polipeptídica heteroespecífica, tal como aqui divulgada, para a preparação de um medicamento para tratar, prevenir e/ou aliviar os sintomas dos distúrbios sensíveis à modulação por um composto terapêutico anti-alvo que é capaz de passar através do pele de forma eficaz.

Um aspeto consiste num método para a entrega de um composto terapêutico anti-alvo para a pele, sem ser inativado, por meio da administração por via tópica, a um sujeito, de uma construção polipeptídica heteroespecífica, compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único dirigidos contra o referido alvo.

Um aspeto é um método para a entrega de um composto terapêutico anti-alvo para a corrente sanguínea de um paciente, por administração por via tópica, a um sujeito, de uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único dirigidos contra o referido alvo.

Numa outra concretização, uma construção polipeptídica heteroespecífica compreende ainda um anticorpo de domínio

único transportador (por exemplo, VHH) que atua como um veículo de transporte ativo para o transporte da referida construção polipeptídica heteroespecífica, do lúmen dos pulmões para o sangue.

Uma construção polipeptídica compreende ainda um transportador que se liga especificamente a um recetor presente na superfície das mucosas (células epiteliais brônquicas), resultando no transporte ativo do polipéptido a partir do lúmen dos pulmões para o sangue. O anticorpo de domínio único transportador pode ser fundido com a construção polipeptídica. Tais construções de fusão são realizadas utilizando métodos conhecidos na técnica e são aqui descritas. O anticorpo de domínio único "transportador" liga-se especificamente a um recetor na superfície da mucosa que induz uma transferência ativa através da superfície.

Um outro aspeto consiste num método para determinar quais os anticorpos de domínio único (por exemplo, VHHs) são ativamente transportados para a corrente sanguínea após a administração nasal. Do mesmo modo, uma biblioteca de fagos de VHH naturais ou imune pode ser administrada por via nasal, e depois de diferentes pontos de tempo após a administração, o sangue ou órgãos podem ser isolados para resgatar fagos que foram transportados ativamente para a corrente sanguínea. Um exemplo não limitativo de um recetor para o transporte ativo do lúmen do pulmão para a corrente sanguínea é o recetor N de Fc (FcRn). Um aspeto da invenção inclui as moléculas de VHH identificadas pelo método. Tal VHH pode então ser utilizado como um transportador de VHH para a entrega de um VHH terapêutico para o alvo correspondente na corrente sanguínea após a administração nasal.

Uma forma de realização consiste numa construção polipeptídica heteroespecífica para utilização no tratamento, prevenção e/ou o alívio dos sintomas de desordens que requerem a entrega de um composto terapêutico por via intravenosa. Um aspeto da invenção consiste num método para tratar, prevenir e/ou aliviar os sintomas de doenças que requerem a administração de um composto terapêutico através da corrente sanguínea.

Uma outra forma de realização consiste numa construção polipeptídica heteroespecífica, como aqui divulgada, para utilização no tratamento, prevenção e/ou o alívio dos sintomas de uma doença que requer um composto terapêutico ou de diagnóstico, que não é rapidamente eliminado da circulação. Um aspeto da invenção é a utilização da referida dita construção para a preparação de um medicamento para tratar, prevenir e/ou aliviar os sintomas de uma desordem requerendo um composto terapêutico ou de diagnóstico, que não é rapidamente eliminado da circulação. Outro aspeto da invenção é um método para tratar, prevenir e/ou aliviar os sintomas de uma desordem requerendo um composto terapêutico ou de diagnóstico, que não é rapidamente removido da circulação, através da administração de uma construção polipeptídica heteroespecífica, como aqui revelada, a um indivíduo. De acordo com a presente invenção, o anticorpo de domínio único anti-alvo do referido polipéptido heteroespecífico é dirigido contra um alvo envolvido na causa ou manifestação da referida desordem, ou envolvido em causar os sintomas da mesma. Utilizando uma construção polipeptídica heteroespecífica da presente invenção para tratar ou diagnosticar uma desordem acima mencionada, a depleção da referida construção é retardada.

Uma outra forma de realização é uma construção polipeptídica heteroespecífica, tal como aqui descrita, para utilização no tratamento, prevenção e/ou o alívio dos sintomas de uma doença que requer um composto terapêutico ou de diagnóstico, que continua ativo na circulação durante períodos de tempo prolongados. Um aspeto da invenção é a utilização da referida construção para a preparação de um medicamento para tratar, prevenir e/ou aliviar os sintomas de uma doença que requer um composto terapêutico ou de diagnóstico que continua ativo na circulação durante períodos de tempo prolongados. Outro aspeto da invenção é um método para tratar, prevenir e/ou aliviar os sintomas de uma desordem requerendo um composto terapêutico ou de diagnóstico que é capaz de circular no soro de pacientes durante vários dias, através da administração de uma construção polipeptídica heteroespecífica, como aqui divulgada, num indivíduo. De acordo com a presente invenção, o anticorpo de domínio único anti-alvo do referido polipéptido heteroespecífico é dirigido contra um alvo envolvido na causa ou manifestação da referida desordem, ou envolvido em causar sintomas da mesma. Utilizando uma construção polipeptídica heteroespecífica da presente invenção para tratar ou diagnosticar um distúrbio acima mencionado, a frequência de tratamento é reduzida, resultando assim numa diminuição de custos de tratamento.

Uma outra forma de realização consiste numa construção polipeptídica heteroespecífica, como aqui divulgada, para utilização no tratamento, prevenção e/ou o alívio dos sintomas de uma desordem relacionada com alergias. Um aspeto é a utilização da referida construção para a preparação de um medicamento para tratar, prevenir e/ou aliviar os sintomas de uma desordem relacionada com alergias. Outro aspeto da invenção é um método para tratar, prevenir e/ou aliviar os sintomas de uma desordem

relacionada com alergia, através da administração de uma construção polipeptídica heteroespecífica, como aqui revelada, a um indivíduo. De acordo com a presente invenção, o anticorpo de domínio único anti-alvo do referido polipéptido heteroespecífico é dirigido contra um alvo envolvido na causa ou manifestação da referida desordem, ou envolvido em causar sintomas da mesma.

Os aspetos anteriores e formas de realização da invenção também se aplicam quando um anticorpo de domínio único anti-soro das construções polipeptídicas heteroespecíficas acima referidas, correspondem a uma sequência representada por SEQ ID NO: 1 uma sequência homóloga da mesma, tal como definido nas reivindicações.

Os aspetos e formas de realização anteriores também se aplicam quando uma construção polipeptídica heteroespecífica da invenção corresponde a uma sequência representada por qualquer uma das SEQ ID Nos: 5 a 18, uma sequência homóloga da mesma, uma parte funcional desta, ou uma sequência homóloga de uma parte funcional. As referidas sequências compreendem um anticorpo VHH anti-TNF-alfa *Camelidae*.

Os aspetos e formas de realização anteriores também se aplicam quando construções polipeptídicas heteroespecíficas da invenção correspondem a uma sequência representada por qualquer uma das SEQ ID NOs: 19 e 21, uma sequência homóloga da mesma, uma parte funcional desta, ou uma sequência homóloga de uma porção funcional. As referidas sequências compreendem um VHH anti-vWF *Camelidae*.

Os aspetos e formas de realização anteriores também se aplicam quando as construções polipeptídicas heteroespecíficas da invenção correspondem a uma sequência

representada por qualquer uma das SEQ ID NOs: 22 a 24, uma sequência homóloga da mesma, uma porção funcional do mesmo. As referidas sequências compreendem um VHH anti-IgE *Camelidae*.

Os aspetos e formas de realização anteriores também se aplicam quando uma construção polipeptídica heteroespecífica, de acordo com a invenção, corresponde a uma sequência representada por qualquer uma das SEQ ID NOs: 25 a 27, uma sequência homóloga da mesma, uma parte funcional desta, ou uma sequência homóloga de uma porção funcional. As referidas sequências compreendem um VHH anti-interferão-gama *Camelidae*.

Um exemplo não limitativo, em relação a alergias, de um alvo contra o qual um anticorpo de domínio único anti-alvo pode ser dirigida é IgE. Durante o seu tempo de vida, os indivíduos podem desenvolver uma reação alérgica a parasitas inofensivos, tal como *Dermatophagoides pteronyssinus*, o ácaro do pó da casa ou a substâncias, tais como aglomerados, plásticos, metais. Tal resulta numa indução de moléculas de IgE, que inicia uma cascata de reações imunológicas. Um aspeto da presente invenção consiste numa construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-IgE fundidos a um ou mais anticorpos de domínio único da proteína anti-soro. Em um aspeto da invenção, os referidos anticorpos de domínio único anti-IgE impedem a interação do IgE com seu(s) recetor(s) em mastócitos e basófilos, bloqueando assim a iniciação da cascata imunológica e uma subsequente reação alérgica. Num outro aspeto, um anticorpo de domínio único da proteína anti-soro é dirigida para uma das proteínas do soro do sujeito. Assim, uma construção polipeptídica heteroespecífica, como aqui divulgada, reduz

ou impede uma reação alérgica devido a alérgenos comuns ou incomuns. Adicionalmente, a construção tem um tempo de vida prolongado no sangue, aumentando assim a janela terapêutica.

O factor de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), acredita-se desempenhar um papel importante em várias doenças, por exemplo em doenças inflamatórias, tais como artrite reumatóide, doença de Crohn, colite ulcerativa e esclerose múltipla. Tanto o TNF-alfa e os recetores (CD120a, CD120b) foram estudados em grande detalhe. O TNF-alfa na sua forma bioativa é um trímero e o sulco formado por subunidades vizinhas é importante para a interação do recetor de citocina. Têm sido desenvolvidas várias estratégias para antagonizar a ação da citocina e são atualmente utilizadas para o tratamento de vários estados de doença.

Um inibidor de TNF, que tem especificidade e seletividade suficiente para o TNF pode ser um composto farmacêutico profilático ou terapêutico, eficaz para a prevenção ou tratamento de doenças inflamatórias. No entanto, é extremamente difícil e um processo demorado para desenvolver uma pequena entidade química (NCE) com potência e seletividade suficiente para tal sequência alvo. As terapias à base de anticorpos, por outro lado, têm um significativo potencial como fármacos porque têm excelente especificidade para o alvo e uma toxicidade inerente reduzida. Além disso, o tempo de desenvolvimento pode ser consideravelmente reduzido quando comparado com o desenvolvimento de novas entidades químicas (NCE). No entanto, os anticorpos convencionais são difíceis de extrair contra proteínas multiméricas em que o domínio de ligação ao recetor do ligando está inserido num sulco, como é o caso com o TNF-alfa.

As construções polipeptídicas heteroespecíficas da presente invenção, em que o anticorpo de domínio único anti-alvo é dirigido contra o TNF-alfa, superam os problemas encontrados ao utilizar péptidos terapêuticos da área técnica, devido às propriedades tais como a estabilidade, o tamanho e expressão fiável. Adicionalmente, os inventores descobriram que, apesar da presença de um sulco no TNF-alfa multimérico, as construções polipeptídicas heteroespecíficas ainda são capazes de alcançar uma forte ligação ao TNF-alfa.

Uma outra forma de realização é uma construção polipeptídica heteroespecífica, como aqui divulgada, para utilização no tratamento, prevenção e/ou o alívio dos sintomas de um distúrbio mediado por moléculas inflamatórias. Um aspeto da invenção é a utilização da referida construção para a preparação de um medicamento para tratar, prevenir e/ou aliviar os sintomas de um distúrbio mediado por moléculas inflamatórias. Outro aspeto da invenção é um método para tratar, prevenir e/ou aliviar os sintomas de um distúrbio mediado por moléculas inflamatórias, pela administração de uma construção polipeptídica heteroespecífica, como aqui revelada, a um indivíduo. De acordo com a presente invenção, um anticorpo de domínio único anti-alvo, do referido polipéptido heteroespecífico, é dirigido contra um alvo envolvido na causa ou manifestação da referida desordem, ou envolvido em causar sintomas da mesma.

De acordo com um aspeto da invenção, um alvo contra o qual um anticorpo de domínio único de uma construção polipeptídica heteroespecífica é dirigido é o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa). Acredita-se que o TNF-alfa desempenha um papel importante em várias doenças, por exemplo em doenças inflamatórias, tais como artrite

reumatóide, doença de Crohn, colite ulcerativa e esclerose múltipla.

Os anticorpos de domínio único anti-alvo podem ser dirigidos contra todo o TNF-alfa ou um seu fragmento, ou um fragmento de uma sequência homóloga da mesma.

Um aspeto refere-se a uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-TNF-alfa fundido com um ou mais anticorpo de domínio único da proteína anti-soro, as sequências do referido polipéptido heteroespecífico correspondem a uma qualquer das SEQ ID NOs: 5 a 18. Neste caso, os anticorpos de domínio único anti-TNF-alfa são derivados a partir de anticorpos de cadeia pesada de *Camelidae* (VHHs), que se ligam a TNF-alfa.

Uma forma de realização da presente invenção consiste numa construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-TNF-alfa fundidos a um ou mais anticorpos de domínio único da proteína anti-soro, para utilização no tratamento, prevenção e/ou alívio dos sintomas de desordens inflamatórias. O TNF-alfa está envolvido em processos inflamatórios e o bloqueamento da ação de TNF-alfa pode ter um efeito anti-inflamatório, o que é altamente desejável em certos estados de doença como, por exemplo, a doença de Crohn. A entrega oral desta construção polipeptídica heteroespecífica resulta na entrega de tais moléculas numa forma ativa no cólon em locais que são afetados pela doença. Estes locais são altamente inflamados e contêm células que produzem TNF-alfa. Estas construções polipeptídicas heteroespecíficas podem neutralizar o TNF-alfa localmente, evitando a sua distribuição ao longo de todo o corpo, e assim limitando os efeitos secundários negativos. Os microrganismos

geneticamente modificados, tais como *Micrococcus lactis* são capazes de segregar fragmentos de anticorpos. Tais microrganismos modificados podem ser utilizados como veículos para a produção local e entrega de fragmentos de anticorpos no intestino. Ao utilizar uma estirpe que produz uma construção polipeptídica heteroespecífica TNF-alfa neutralizante, a doença inflamatória do intestino pode ser tratada.

Um outro aspeto é uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-TNF-alfa fundidos com um ou mais anticorpos de domínio único da proteína anti-soro para utilização no tratamento, prevenção e/ou alívio de desordens relacionadas com processos inflamatórios, em que a referida construção polipeptídica heteroespecífica é administrada por via intravenosa, por via oral, sublingual, tópica, nasal, vaginal, retal ou por inalação.

Um outro aspeto é a utilização de uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-TNF-alfa fundidos com um ou mais anticorpos de domínio único da proteína anti-soro para a preparação de um medicamento para o tratamento, prevenção e/ou o alívio de perturbações relacionadas com processos inflamatórios, em que a referida construção polipeptídica heteroespecífica é administrada por via intravenosa, por via oral, sublingual, tópica, nasal, vaginal, retal ou por inalação.

Um outro aspeto consiste num método de tratamento, prevenção e/ou alívio de desordens relacionadas com processos inflamatórios, que compreende a administração a um sujeito de uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-

TNF-alfa fundidos com um ou mais anticorpos de domínio único de proteína anti-soro, por via intravenosa, por via oral, sublingual, tópica, nasal, vaginal, retal ou por inalação.

Um outro aspeto é uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-TNF-alfa fundidos com um ou mais anticorpos de domínio único da proteína anti-soro para utilização no tratamento, prevenção e/ou alívio de desordens relacionadas com processos inflamatórios.

Um outro aspeto é uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-TNF-alfa fundidos com um ou mais anticorpos de domínio único da proteína anti-soro, para a preparação de um medicamento para o tratamento, prevenção e/ou alívio de desordens relacionadas com os processos inflamatórios.

É um aspeto da invenção, que os anticorpos de domínio único anti-TNF-alfa da presente invenção podem ser derivados de VHHs de qualquer classe. Por exemplo, podem ser derivados de uma classe de VHHs com elevada homologia com a sequência de VH humano, ou pode ser derivada de qualquer uma das outras classes de VHHs, incluindo a classe principal de VHH. Estes VHHs incluem o comprimento total de VHHs *Camelidae*, domínios e pode compreender um domínio Fc humano se forem necessárias funções efetoras.

Os aspetos e formas de realização acima referidas aplicam-se a uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-TNF-alfa fundidos com um ou mais anticorpos de domínio único da proteína anti-soro, em que o referido polipéptido

heteroespecífico corresponde a uma sequência representada por qualquer SEQ ID NO: 5 a 18, de uma sequência homóloga da mesma, uma parte funcional do mesmo, de uma sequência homóloga de uma parte funcional da mesma. As SEQ ID NOs: 5 a 18 compreendem VHH anti-TNF alfa de *Camelidae* e VHH anti-rato de albumina sérica de *Camelidae*.

Os aspetos e formas de realização acima referidas aplicam-se a uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-TNF-alfa fundidos com um ou mais anticorpos de domínio único de proteína anti-soro, em que os referidos anticorpos de domínio único da proteína anti-soro correspondem à SEQ ID NO: 1 (VHHs de proteína anti-soro *Camelidae*), uma sequência homóloga desta, tal como definido nas reivindicações.

Os inventores descobriram que uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo uma sequência correspondente a qualquer das SEQ ID NOs: 5 a 18 surpreendentemente exibe uma maior afinidade para o seu alvo do que a que era esperada e uma semi-vida prolongada no sistema circulatório.

A agregação mediada por plaquetas é o processo em que o factor de ligação von Willebrand (vWF) do colagénio adere às plaquetas e/ou recetores de plaquetas (exemplos de ambos são gpla/lla, gplb, ou colagénio), em última análise, resultam na ativação das plaquetas. A ativação de plaquetas conduz à ligação de fibrinogénio, e, finalmente, à agregação plaquetária. A capacidade para romper a agregação mediada por plaquetas tem muitas aplicações, incluindo o tratamento de doença, como mencionado abaixo. Uma vez que as construções polipeptídicas heteroespecíficas da invenção é eficaz para prevenir a coagulação e a semi-vida do mesmo

é controlável, podem ser utilizadas para procedimentos cirúrgicos, por exemplo, que requerem uma inibição da agregação mediada por plaquetas por um período de tempo limitado.

Os anticorpos de domínio único monovalentes, tais como VHHs mostram uma surpreendentemente elevada inibição da agregação de plaquetas em experiências para medir a inibição da agregação de plaquetas, sob elevado corte: 50% de inibição da agregação plaquetária foi obtida com uma concentração entre 4 e 25 nM. Em comparação, o fragmento Fab derivado de um anticorpo específico de vWF, inibindo a interação com o colagénio, 82D6A3, inibe 50% da agregação de plaquetas a uma concentração de cerca de vinte vezes maior (Vanhoorelbeke K. et al, Journal of Biological Chemistry, 2003, 278: 37815-37821). Estes resultados foram inesperados tendo em conta que os valores de IC50 para a VHH monovalente são até 225 vezes pior em ELISA, do que o valor de IC50 do IgG de 82D6A3.

Tal demonstra claramente que os anticorpos IgG não são adequados para a interação com macromoléculas que estão iniciando, ou estão no processo de agregação, tais como os envolvidos na agregação mediada por plaquetas, vWF torna o tamanho dos multímeros em até 60 monómeros (os multímeros finais têm até 20 milhões daltons de tamanho). Assim, foi demonstrado que nem todos os domínios A3 são acessíveis a 82D6A3 (Dongmei WU, Blood, 2002, 99, 3623-3628). Além disso, o grande tamanho dos anticorpos convencionais, iria restringir a penetração do tecido, por exemplo, durante a agregação mediada por plaquetas no local do vaso danificado.

A estrutura de anticorpos de domínio único, em particular, é única. Por exemplo moléculas de VHH derivadas de

anticorpos *Camelidae* estão entre os domínios mais pequenos de ligação ao antigénio intacto conhecidos (cerca de 15 kDa, ou 10 vezes menor do que uma IgG convencional) e, portanto, estão bem adaptadas em relação à entrega em tecidos densos e para aceder ao espaço limitado entre as macromoléculas que participam ou iniciam o processo de agregação mediada por plaquetas.

De nosso conhecimento, esta é a primeira vez que as experiências mostram, que o pequeno tamanho de um VHH é vantajoso relativamente a um grande anticorpo intacto para a inibição das interações entre estas macromoléculas grandes.

Apesar do pequeno tamanho de nanocorpos e, por conseguinte, vantagens de penetração, é ainda surpreendente que uma tal molécula pequena possa inibir as interações entre os grandes polímeros, tais como o vWF (até 60 monómeros) e o colagénio e com uma eficiência elevada. Tem sido descrito que apenas as grandes formas multiméricas de vWF são hemostaticamente ativas (Furlan, M,. 1996, Ann. Hematol. 72:341-348). A ligação do vWF multimérico ao colagénio ocorre com ~100 vezes maior afinidade do que a ligação de fragmentos de vWF monoméricos.

Os resultados dos ensaios de elevado corte indicam que será necessária uma dose mais baixa para administração a pacientes. Portanto, menos efeitos colaterais são esperados (tais como problemas de imunogenicidade ou sangramento).

Um aspeto da presente invenção consiste em proporcionar construções polipeptídicas heteroespecíficas que modulam os processos que compreendem a agregação mediada por plaquetas, tais como, por exemplo, ligação vWF-colagénio, adesão do recetor do vWF a plaquetas, adesão recetor do

colagénio a plaquetas, ativação de plaquetas, ligação do fibrinogénio e/ou a agregação de plaquetas. As referidas construções polipeptídicas heteroespecíficas são derivadas a partir de anticorpos de domínio único dirigidos para os domínios vWF, vWF A1 ou A3, gplb ou colagénio.

Os anticorpos de domínio único anti-alvo podem ser dirigidos contra todos os domínios vWF, vWF A1 ou A3, gplb ou colagénio, ou um seu fragmento, ou um fragmento de uma sequência homóloga da mesma.

De acordo com um aspeto da invenção, um alvo contra o qual uma construção polipeptídica heteroespecífica, compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-alvo fundidos com uma ou mais anticorpos de domínio único de proteínas anti-soro, é dirigida é o fator von Willebrand (vWF). De acordo com um outro aspeto da invenção, os alvos consistem nos domínios vWF A1 ou A3. De acordo com um outro aspeto da invenção, o alvo é gplb. De acordo com um outro aspeto da invenção, o alvo é gpla/LLA. De acordo com um outro aspeto da invenção, o alvo é colagénio.

Um aspeto da presente invenção refere-se a uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-vWF fundidos com um ou mais VHHs de proteína anti-soro, as sequências do referido polipéptido heteroespecífico correspondem uma qualquer das SEQ ID NOs: 19 a 21. Os anticorpos de domínio único anti-vWF aí são derivados a partir de anticorpos de cadeia pesada de *Camelidae* (VHHs), que se ligam ao vWF.

Uma forma de realização da presente invenção consiste numa construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-alvo fundida com uma ou mais anticorpos de domínio único de proteínas do

soro anti-alvo, em que o alvo é qualquer domínio de vWF, vWF A1 ou A3, gplb ou colagénio para utilização no tratamento, prevenção e/ou alivio dos sintomas de distúrbios ou patologias relacionadas com a agregação mediada por plaquetas ou disfunção dos mesmos. Os referidos distúrbios incluem acidente isquémico transitório cerebral, angina instável, enfarto cerebral, enfarto do miocárdio, doença arterial oclusiva periférica, reestenose. As referidas condições incluem as resultantes da enxerto *bypass* coronário, substituição da válvula da artéria coronária e intervenções coronárias, tais como a angioplastia, implante de stent ou aterectomia.

Um aspeto é uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-alvo fundido com um ou mais anticorpos de domínio único da proteína anti-soro, em que o alvo é qualquer domínio vWF, vWF A1 ou A3 ou colagénio para utilização no tratamento, prevenção e/ou alívio de distúrbios ou condições relacionadas com a agregação mediada por plaquetas ou disfunção dos mesmos, em que a referida construção polipeptídica heteroespecífica é administrada por via intravenosa, via oral, sublingual, tópica, nasal, vaginal, retal ou por inalação.

Um outro aspeto é a utilização de uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-alvo fundido com um ou mais alvos de anticorpos de domínio único da proteína anti-alvo, em que o alvo é qualquer domínio de vWF, vWF A1 ou A3 ou colagénio, para a preparação de um medicamento para o tratamento, prevenção e/ou alívio de distúrbios ou condições relacionadas com a agregação mediada por plaquetas ou disfunção dos mesmos, em que a referida construção polipeptídica heteroespecífica é administrada

por via intravenosa, por via oral, sublingual, tópica, nasal, vaginal, retal ou por inalação.

Um outro aspeto consiste num método de tratamento, prevenção e/ou alívio de distúrbios ou condições relacionadas a agregação mediada por plaquetas ou disfunção dos mesmos, compreendendo a administração a um sujeito de uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-alvo fundidos com uma ou mais alvos de anticorpos de domínio único da proteína anti-alvo, em que o alvo é qualquer domínios de vWF, vWF A1 ou A3 ou de colagénio, em que a referida construção polipeptídica heteroespecífica é administrada por via intravenosa, oral, sublingual, tópica, nasal, vaginal, retal ou por inalação.

Outro aspeto da invenção é uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-alvo fundido com um ou mais anticorpos de domínio único da proteína anti-soro, em que o alvo é qualquer domínios vWF, vWF A1 ou A3 ou colagénio para utilização no tratamento, prevenção e/ou alívio de distúrbios ou condições relacionadas com a agregação mediada por plaquetas ou disfunção dos mesmos.

Um outro aspeto é a utilização de uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-alvo fundido com um ou mais anticorpos de domínio único da proteína anti-soro , em que o alvo é qualquer domínios vWF, vWF A1 ou A3 ou colagénio para a preparação de um medicamento para o tratamento, prevenção e/ou alívio de distúrbios ou condições relacionadas com a agregação mediada por plaquetas ou disfunção dos mesmos.

É um aspeto da invenção, que os anticorpos VHHs anti-vWF, anti-vWF A1 ou anti-vWF A3 ou anti-colagénio da presente invenção podem ser derivados a partir de VHHs de qualquer classe. Por exemplo, podem ser derivados a partir da classe de VHHs com elevada homologia com a sequência de VH humano, ou podem ser derivados de qualquer uma das outras classes de VHHs, incluindo a classe principal de VHH. Estes VHHs incluem o comprimento total dos VHHs de *Camelidae*, domínios e podem compreender um domínio de Fc humano se forem necessárias funções efetoras.

Os aspetos e formas de realização acima referidos aplicam-se a uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-vWF em que o referido polipéptido heteroespecífico corresponde uma sequência representada por qualquer uma das SEQ ID NOs: 19 a 21, uma sequência homóloga desta, uma parte funcional do mesmo, uma sequência homóloga de uma parte funcional da mesma. As SEQ ID NOs: 19 a 21 compreendem VHH anti-vWF e VHH de albumina do soro anti-rato.

Os aspetos e formas de realização acima referidas aplicam-se a uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-alvo fundidos com um ou mais anticorpos de domínio único de proteínas anti-soro, em que o alvo é qualquer domínio de vWF, vWF A1 ou A3, gplb ou colagénio e em que os referidos anticorpos de domínio único da proteína anti-soro correspondem a SEQ ID NO: 1, uma sequência homóloga desta, tal como definido nas reivindicações.

Durante a sua vida, os indivíduos podem desenvolver uma reação alérgica a parasitas inofensivos (por exemplo, *Dermatophagoides pteronyssinus*, ácaros) ou substâncias

(aglomerados, plásticos, metais). Tal resulta na indução de moléculas de IgE que iniciam uma cascata de respostas imunológicas. Um aspeto da presente invenção é uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-IgE, a referida construção polipeptídica heteroespecífica previne a interação da IgE com o(s) recetor(es) de mastócitos e basófilos. Como tal, impedem a iniciação da cascata imunológica, uma reação alérgica.

De acordo com um aspeto da invenção, um alvo contra o qual uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-alvo fundido com um ou mais anticorpos de domínio único da proteína anti-soro é dirigida é IgE. Os anticorpos referidos podem ser dirigidos contra toda a IgE ou um seu fragmento, ou um fragmento de uma sequência homóloga da mesma.

Um aspeto refere-se a uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-IgE fundidos a um ou mais anticorpos de domínio único da proteína anti-soro, em que as sequências do referido polipéptido heteroespecífico correspondente a qualquer das SEQ ID NOs: 22 a 24. Os anticorpos de domínio único anti-IgE são derivados a partir de anticorpos de cadeia pesada de *Camelidae* (VHHs), que se ligam a IgE.

Os anticorpos de domínio único anti-alvo podem ser dirigidos contra todo IgE-alfa ou um seu fragmento, ou um fragmento de uma sequência homóloga da mesma.

Uma forma de realização consiste numa construção polipeptídica heteroespecífica que compreende um ou mais anticorpos de domínio único anti-IgE fundido a um ou mais anticorpos de domínio único da proteína anti-soro, para

utilização no tratamento, prevenção e/ou alívio dos sintomas de distúrbios relacionados com alergias. Os referidos distúrbios compreendem uma vasta gama de doenças mediadas por IgE, tais como febre dos fenos, asma, dermatite atópica, reações alérgicas da pele, reações alérgicas dos olhos e alergias alimentares.

Um aspeto é uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-IgE fundidos a um ou mais anticorpos de domínio único da proteína anti-soro para utilização no tratamento, prevenção e/ou alívio dos distúrbios relacionados com alergias, em que o referido VHH é administrado por via intravenosa, por via oral, sublingual, tópica, nasal, vaginal, retal ou por inalação.

Um outro aspeto é a utilização de uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-IgE fundidos a um ou mais anticorpos de domínio único de proteínas anti-soro, para a preparação de um medicamento para o tratamento, prevenção e/ou alívio de distúrbios relacionados com alergias, em que a referida construção polipeptídica heteroespecífica é administrada por via intravenosa, por via oral, sublingual, tópica, nasal, vaginal, retal ou por inalação.

Um outro aspeto é um método de tratamento, prevenção e/ou alívio de desordens relacionadas com alergias, compreendendo a administração a um sujeito de uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-IgE fundidos a um ou mais anticorpos de domínio único de proteína anti-soro, por via intravenosa, por via oral, sublingual, tópica, nasal, vaginal, retal ou por inalação.

Um outro aspeto é uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-IgE fundidos a um ou mais anticorpos de domínio único da proteína anti-soro, para utilização na preparação de um medicamento para o tratamento, prevenção e/ou alívio de desordens relacionadas com alergias.

Um outro aspeto é a utilização de uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-IgE fundidos a um ou mais anticorpos de domínio único da proteína anti-soro, para a preparação de um medicamento para o tratamento, prevenção e/ou alívio de distúrbios relacionados com alergias.

É um aspeto que os anticorpos de domínio único anti-IgE da presente invenção podem ser derivados a partir de VHHs de qualquer classe. Por exemplo, podem ser derivados a partir de uma classe de VHHs com elevada homologia com a sequência de VH humano, ou podem ser derivados de qualquer uma das outras classes de VHHs, incluindo a classe principal de VHH. Os referidos VHHs podem ser derivados a partir de Camelídeos. Estes VHHs incluem o comprimento total de VHHs de Camelidae, domínios e podem compreender um domínio de Fc humano se forem necessárias funções efetoras.

Os aspetos e formas de realização acima referidas aplicam-se a uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-IgE fundidos a um ou mais anticorpos de domínio único da proteína anti-soro, em que os polipéptidos heteroespecíficas correspondem a uma sequência representada por qualquer uma das SEQ ID NOs: 22 a 24, uma sequência homóloga da mesma, uma parte funcional do mesmo, uma sequência homóloga de uma parte funcional da mesma. As SEQ

ID NOs: 22 a 24 compreendem VHH anti-IgE de *Camelidae* e VHH de albumina de soro anti-rato *Camelidae*.

Os aspetos e formas de realização acima referidas aplicam-se a uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-IgE fundidos a um ou mais anticorpos de domínio único da proteína anti-soro, em que os referidos anticorpos de domínio único da proteína anti-soro correspondem à SEQ ID NOs: 1 (VHHs anti-proteína de soro de Camelídeos), uma sequência homóloga desta, tal como definido nas reivindicações.

Uma construção polipeptídica heteroespecífica como aqui divulgada, reduz ou impede uma reação alérgica devido a alérgenos comuns ou incomuns. Adicionalmente, a construção tem um tempo de vida prolongado no sangue, aumentando assim a janela terapêutica.

Acredita-se que o interferão gama (IFN-gama), desempenha um papel importante em várias doenças, por exemplo em doenças inflamatórias, tais como artrite reumatóide, doença de Crohn, doença inflamatória do intestino, colite ulcerativa, esclerose múltipla e reações hiper-imunes no olho. O IFN-gama também tem mostrado desempenhar um papel importante na patologia de doenças autoimunes. Por exemplo, a presença de IFN-gama tem sido implicada em artrite reumatóide (Brennan, et al, Brit. J. Rheum., 31, 293-8 (1992)). Várias estratégias para antagonizar a ação dessas citocinas têm sido desenvolvidas e são atualmente utilizadas para tratar várias doenças.

o IFN-gama, na sua forma bioativa, é um dímero e o sulco formado pelas duas subunidades é importante para a sua atividade biológica através da interação com o recetor de

IFN-gama. Um inibidor de IFN-gama, que tem especificidade e seletividade suficiente para que o IFN-gama possa ser um composto farmacêutico profilático ou terapêutico eficaz para a prevenção ou tratamento de doenças inflamatórias. As doenças associadas com o IFN-gama incluem esclerose múltipla, artrite reumatóide, espondilite anquilosante, artrite reumatóide juvenil e artrite psoriática (US 6333032 Advanced Biotherapy Concepts, Inc.). Outras doenças incluem a doença de Crohn e psoríase (US 6329511 Protein Design Labs). No entanto, outras doenças são a doença do intestino, colite ulcerativa e doença de Crohn (EP0695189 Genentech).

Nenhum dos fármacos presentemente disponíveis são completamente eficazes para o tratamento de doenças autoimunes e são limitados pela toxicidade grave. Além disso, é extremamente difícil e é um processo demorado para desenvolver uma nova entidade química (NCE) com potência e seletividade suficiente para tal sequência alvo. As terapias à base de anticorpos, por outro lado, têm um significativo potencial como fármacos porque têm uma excelente especificidade para o alvo e uma toxicidade inerente reduzida. Adicionalmente, o tempo de desenvolvimento pode ser consideravelmente reduzido quando comparado com o desenvolvimento de novas entidades químicas (NCE). No entanto, os anticorpos convencionais são difíceis de atuar contra proteínas multiméricas, em que o domínio de ligação ao recetor do ligando está inserido num sulco, como é o caso do IFN-gama.

As construções polipeptídicas heteroespecíficas da presente invenção, em que o anticorpo de domínio único anti-alvo é dirigido contra o TNF-alfa, superam os problemas da experienciados quando utilizada a terapêutica de péptidos, da área técnica, devido às suas propriedades, tais como a

estabilidade, o tamanho e expressão fiável. Além disso, os inventores descobriram que, apesar da presença de um sulco no IFN-gama multimérico, as construções polipeptídicas heteroespecíficas ainda são capazes de alcançar uma forte ligação IFN-gama.

De acordo com um aspeto, um alvo contra o qual um ou mais anticorpos de domínio único anti-alvo de uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-alvo fundido com um ou mais anticorpos de domínio único da proteína anti-soro é dirigido é o interferão-gama (IFN-gama). IFN-gama é segregado por algumas células T. Para além da sua atividade anti-viral, o IFN-gama estimula as células assassinas naturais (NK) e células T auxiliares 1 (Th1), ativa macrófagos e estimula a expressão de moléculas de MHC na superfície das células. Assim, o IFN-gama, geralmente serve para melhorar muitos aspetos da função imunitária e é um candidato para o tratamento de doenças em que o sistema imunitário está mais ativo, por exemplo Doença de Crohn, doenças autoimunes e rejeição de órgãos, em adição as desordens inflamatórias, tais como artrite reumatóide, doença de Crohn, colite ulcerativa e esclerose múltipla.

Um aspeto refere-se a uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-IFN-gama, fundidos com um ou mais anticorpos de domínio único anti-proteína de soro, as sequências do referido polipéptido heteroespecífico correspondente a qualquer das SEQ ID NOs: 25 a 27. Os anticorpos de domínio único anti-IFN-gama são derivados a partir de anticorpos de cadeia pesada de *Camelidae* (VHHs), que se ligam a IFN-gama.

Os anticorpos de domínio único anti-alvo individuais podem ser dirigidos contra o IFN-gama inteiro ou um seu fragmento, ou um fragmento de uma sequência homóloga da mesma.

Uma forma de realização é uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-IFN-gama fundidos com um ou mais anticorpos de domínio único da proteína anti-soro, para utilização no tratamento, prevenção e/ou alívio dos sintomas de distúrbios, em que o sistema imunitário é hiperativo, como mencionado acima. A terapia atual consiste na administração intravenosa de anticorpos anti-IFN-gama. A entrega oral dessas construções polipeptídicas heteroespecíficas resulta na entrega de tais moléculas na forma ativa no cólon e em locais que são afetados pela doença. Estes locais encontram-se altamente inflamados e contêm as células produtoras de IFN-gama. Estas construções polipeptídicas heteroespecíficas pode neutralizar o IFN-gama localmente, evitando a sua distribuição ao longo de todo o corpo, e assim limitando os efeitos secundários negativos. Os microrganismos geneticamente modificados, tais como *Micrococcus lactis* são capazes de segregar fragmentos de anticorpos. Tais microrganismos modificados podem ser utilizados como veículos para a produção local e entrega de fragmentos de anticorpos no intestino. Ao utilizar uma estirpe que produz uma construção polipeptídica heteroespecífica neutralizante de IFN-gama, a doença inflamatória do intestino pode ser tratada.

Um outro aspeto é uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-IFN-gama, fundidos a um ou mais anticorpos de domínio único da proteína anti-soro para utilização no tratamento, prevenção e/ou alivio de

perturbações em que o sistema imunitário sistema é hiperativo, em que a referida construção polipeptídica heteroespecífica é administrada por via intravenosa, por via oral, sublingual, tópica, nasal, vaginal, retal ou por inalação.

Um outro aspeto é a utilização de uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anticorpo anti-IFN-gama, fundidos a um ou mais anticorpos de domínio único da proteína anti-soro, para a preparação de um medicamento para o tratamento, prevenção e/ou alívio de perturbações em que o sistema imunitário é mais ativo, em que a referida construção polipeptídica heteroespecífica é administrada por via intravenosa, por via oral, sublingual, tópica, nasal, vaginal, retal ou por inalação.

Um outro aspeto é um método de tratamento, prevenção e/ou alívio de desordens em que o sistema imunitário é hiperativo, compreendendo a administração a um sujeito de uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anticorpo anti-IFN-gama, fundido a um ou mais anticorpos de domínio único de proteína anti-soro, por via intravenosa, por via oral, sublingual, tópica, nasal, vaginal, retal ou por inalação.

Um outro aspeto é uma construção polipeptídica heteroespecífica que compreende um ou mais anticorpos de domínio único anti-IFN-gama associados a um ou mais anticorpos de domínio único da proteína anti-soro para utilização na preparação de um medicamento para o tratamento, prevenção e/ou alívio de desordens em que o sistema imunitário é hiperativo.

Outra aspeto é a utilização de uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-IFN-gama, fundidos com um ou mais anticorpos domínio único da proteína anti-soro, para utilização na preparação de um medicamento para o tratamento, prevenção e/ou o alívio de perturbações em que o sistema imunitário é mais ativo.

É um aspeto que os anticorpos de domínio único anti-IFN-gama da presente invenção podem ser derivados a partir de VHHs de qualquer classe. Por exemplo, podem ser derivados a partir de uma classe de VHHs com elevada homologia com a sequência de VH humano, ou podem ser derivados de qualquer uma das outras classes de VHHs, incluindo a classe principal de VHH. Estes VHHs incluem o comprimento total VHHs *Camelidae*, domínios e podem compreender um domínio de Fc humano quando são necessárias funções efetoras.

Os aspetos e formas de realização acima referidos são aplicáveis para uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo uma ou mais VHHs anti-IFN-gama, fundidos com um ou mais anticorpos de domínio único de proteína anti-soro, em que o referido polipéptido heteroespecífico corresponde a uma sequência representada por qualquer uma das SEQ ID NOs: 25 a 27, uma sequência homóloga da mesma, uma parte funcional da mesma, de uma sequência homóloga de uma porção funcional. As SEQ ID NOs: 25 a 27 compreendem VHH anti-IFN-gama e VHH de albumina de soro anti-rato.

Os aspetos e formas de realização acima referidas aplicam-se a uma construção polipeptídica heteroespecífica compreendendo um ou mais anticorpos de domínio único anti-IFN-gama, fundidos com um ou mais VHHs de proteína anti-soro, em que os referidos VHHs de proteína anti-soro

corresponde a SEQ ID NO: 1, uma sequência homóloga desta, tal como definido nas reivindicações.

Uma forma de realização da presente invenção é um clone recombinante que compreende o ácido nucleico que codifica para a construção polipeptídica heteroespecífica, de acordo com a invenção. Em um aspeto da invenção, o referido ácido nucleico codifica para um ou mais anticorpos de domínio único, cada um dirigido a um antigénio alvo de diagnóstico ou terapêutico e um ou mais anticorpos de domínio único dirigido a uma proteína do soro, os referidos anticorpos de domínio único ligados sem intervir ligantes, ou com uma ou mais sequências de ligantes peptídicos. De acordo com um aspeto da invenção, uma sequência de ligação é qualquer sequência ligante adequada conhecido na técnica. De acordo com um outro aspeto da invenção, uma sequência de ligação é uma sequência que ocorre naturalmente. As propriedades preferidas de sequências ligantes são as que não são imunogenéticas ou não significativamente imunogenéticas, que podem proporcionar flexibilidade suficiente para a construção polipeptídica heteroespecífica e são resistentes à degradação proteolítica. Um exemplo, de um ligante de acordo com a invenção é descrito em PCT/EP96/01725, que é derivado a partir da região em dodradiça de VHH.

De acordo com outro aspeto da invenção, o clone compreende um ácido nucleico que codifica para um polipéptido que corresponde a uma sequência representada por SEQ ID NOs: 1, uma sequência homóloga desta, tal como definido nas reivindicações, e um ácido nucleico codificador de um ou mais anticorpos de domínio único anti-alvo, uma sequência homóloga da mesma, uma parte funcional desta ou uma sequência homóloga de uma parte funcional da mesma.

De acordo com outro aspeto, o clone compreende um ácido nucleico capaz de codificar um polipéptido que corresponde a uma sequência representada por qualquer uma das SEQ ID NOs: 5 a 27, uma sequência homóloga da mesma, uma parte funcional desta, ou uma sequência homóloga de uma porção funcional da mesma.

Está dentro do âmbito da invenção, que ácidos nucleicos que codificam para múltiplos VHHs anti-alvo e/ou anti-soro estão presentes num clone da invenção.

Ao transformar um hospedeiro compatível com um clone que codifica uma construção polipeptídica heteroespecífica da invenção, a construção polipeptídica heteroespecífica pode ser produzida em quantidades suficientes para utilização em terapia. Exemplos de organismos em que o referido clone pode ser transformado incluem, mas não estão limitados a *E. coli* ou *Sacchoromyces cerevisiae*.

Uma outra forma de realização da presente invenção consiste num método para prolongar a semi-vida de um anti-alvo-VHH que compreende o passo de unir aos mesmos um ou mais anticorpos de domínio único de albumina anti-soro. Como já foi mencionado acima, os métodos para a ligação são conhecidos na técnica ou pode ser utilizado um qualquer método futuro, por exemplo, podem ser fundidos por meio de acoplamento químico, fundido ao nível do ADN, etc.

O tratamento, prevenção e/ou o alívio dos sintomas de uma ou mais das doenças mencionadas aqui, geralmente envolve a administração a um sujeito de uma "quantidade terapeuticamente eficaz" da construção polipeptídica heteroespecífica. Por "quantidade terapeuticamente eficaz", "dose terapeuticamente eficaz" e "quantidade eficaz" significa a quantidade necessária para conseguir o

resultado ou resultados desejados. Um perito na especialidade irá reconhecer que a potência e, portanto, uma "quantidade eficaz" pode variar para os vários compostos que inibem a via da desordem utilizada na invenção. Um perito na especialidade pode rapidamente avaliar a potência do composto.

Tal como aqui utilizado, o termo "composto" refere-se a uma construção polipeptídica heteroespecífica, tal como aqui divulgada, um polipéptido representado pela SEQ ID NO: 5 a 27, uma sequência homóloga desta, ou um seu homólogo, ou um ácido nucleico capaz de codificar o referido polipéptido.

Por "farmaceuticamente aceitável" entende-se um material que não é biologicamente ou de outra forma indesejável, isto é, o material pode ser administrado a um indivíduo juntamente com o composto, sem provocar quaisquer efeitos biológicos indesejáveis ou interagir de um modo prejudicial com qualquer um dos outros componentes da composição farmacêutica na qual está contido.

A invenção aqui descrita é útil para o tratamento ou prevenção de uma condição relacionada com um distúrbio, como aqui mencionado (por exemplo, alergia e/ou inflamação), num paciente e que compreende a administração de uma quantidade farmaceuticamente eficaz de um composto ou composição que se liga a um componente envolvido na via da desordem (por exemplo a IgE e/ou a TNF-alfa no fluxo de sanguíneo), provocando a inibição da via de desordem e a desordem.

Um aspeto consiste na utilização de compostos da invenção para o tratamento ou prevenção de uma condição relacionada com um distúrbio, como aqui mencionado (por exemplo alergia e/ou inflamação), num paciente e que compreende a

administração de uma quantidade farmaceuticamente eficaz de um composto em combinação com um outro, tal como, por exemplo, a aspirina.

A presente invenção não se limita à administração de formulações compreendendo um único composto da invenção. Está dentro do âmbito da invenção proporcionar tratamentos de combinação, em que uma formulação que é administrada a um paciente em necessidade do mesmo, compreende mais do que um composto da invenção.

É bem conhecido na técnica como determinar a inibição de uma via de desordem utilizando os testes padrão aqui descritos, ou utilizando outros testes similares. De preferência, o método poderia resultar em pelo menos uma redução de 10% num indicador da doença, incluindo, por exemplo, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, ou qualquer outra quantidade intermédia, mais preferencialmente 90%. Por exemplo, a inibição de uma via alérgica por inibição de IgE por um péptido da invenção pode resultar numa redução de 10% dos níveis de IgE específica para alimentos.

O composto útil na presente invenção pode ser formulado como composições farmacêuticas e administrado a um hospedeiro mamífero, tal como um paciente humano ou um animal numa variedade de formas adaptadas à via de administração escolhida, isto é, por via oral ou parentérica, por via intranasal por inalação, por via intravenosa, intramuscular, tópica ou subcutânea.

O composto da presente invenção também podem ser administrado utilizando os métodos de terapia genética de entrega. Veja-se, por exemplo, a patente US No. 5399346, que é incorporada por referência na sua totalidade.

Utilizando um método de terapia genética de entrega, as células primárias transfetadas com o gene para o composto da presente invenção pode, adicionalmente, ser transfetadas com os promotores específicos de tecidos para atingir órgãos específicos, tecidos, enxertos, tumores ou células.

Assim, o presente composto pode ser administrado sistemicamente, por exemplo, por via oral, em combinação com um veículo farmaceuticamente aceitável, tal como um diluente inerte ou um veículo comestível assimilável. Podem ser confinados em cápsulas de gelatina de casca mole ou dura, pode ser comprimida em comprimidos, ou podem ser incorporados diretamente com o alimento da dieta do paciente. Para a administração terapêutica oral, o composto ativo pode ser combinado com um ou mais excipientes e utilizado na forma de comprimidos ingeríveis, comprimidos bucais, trociscos, cápsulas, elixires, suspensões, xaropes, hóstias e semelhantes. Tais composições e preparações devem conter pelo menos 0,1% do composto ativo. A percentagem das composições e preparações pode, é claro, ser variada e pode estar convenientemente entre cerca de 2 a cerca de 60% do peso de uma dada forma de dosagem unitária. A quantidade de composto ativo em tais composições terapeuticamente úteis é tal que um nível de dosagem eficaz será obtido.

Os comprimidos, pastilhas, comprimidos, cápsulas, e similares podem também conter o seguinte: ligantes, tais como goma tragacanta, acácia, amido de milho ou gelatina; excipientes, tais como fosfato dicálcio; um agente de desintegração, tal como amido de milho, amido de batata, ácido algínico e similares; um lubrificante, tal como estearato de magnésio; e um agente edulcorante, tal como sacarose, frutose, lactose ou aspartame; ou um agente aromatizante, tal como hortelã-pimenta, óleo de gaultéria, ou aroma de cereja, podem ser adicionados. Quando a forma

de unidade de dosagem é uma cápsula, ela pode conter, em adição aos materiais acima referidos, um veículo líquido, tal como um óleo vegetal ou um polietilenoglicol. Vários outros materiais podem estar presentes como revestimentos ou para, de outra forma, modificar a forma física da forma de dosagem sólida unitária. Por exemplo, comprimidos, pílulas, ou cápsulas podem ser revestidos com gelatina, cera, goma-laca ou açúcar e outros semelhantes. Um xarope ou elixir pode conter o composto ativo, sacarose ou frutose como agente edulcorante, metil e propilparabenos como conservantes, um corante e aromatizante, tal como aroma de cereja ou de laranja. Claro que, qualquer material utilizado na preparação de qualquer forma de unidade de dosagem deverá ser farmaceuticamente aceitável e substancialmente não tóxica nas quantidades empregues. Adicionalmente, o composto ativo pode ser incorporado em preparações e dispositivos de libertação sustentada.

O composto ativo pode também ser administrado por via intravenosa ou intraperitoneal, por infusão ou injeção. As soluções do composto ativo ou seus sais podem ser preparadas em água, opcionalmente misturadas com um tensioativo não tóxico. As dispersões podem também ser preparadas em glicerol, polietilenoglicóis líquidos, triacetina, e suas misturas e em óleos. Sob condições normais de armazenamento e utilização, estas preparações contêm um conservante para evitar o crescimento de microrganismos.

As formas farmacêuticas de dosagem adequadas para injeção ou infusão podem incluir soluções ou dispersões aquosas estéreis ou pós estéreis, compreendendo o ingrediente ativo, que são adaptados para a preparação extemporânea de soluções injetáveis ou infusíveis estéreis ou dispersões, opcionalmente encapsuladas em lipossomas. Em todos os

casos, a forma de dosagem final deve ser estéril, fluida e estável sob as condições de fabrico e armazenamento. O transportador ou veículo líquido pode ser um solvente ou meio de dispersão líquido compreendendo, por exemplo, água, etanol, um poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol, polietilenoglicóis líquidos e semelhantes), óleos vegetais, ésteres de glicerilo não tóxicos e suas misturas apropriadas. A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, pela formação de lipossomas, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersões ou pela utilização de surfatantes. A prevenção da acção de microrganismos pode ser provocada por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal e outros semelhantes. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotónicos, por exemplo, açúcares, tampões ou cloreto de sódio. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser provocada pelo uso nas composições de agentes que atrasam a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

As soluções injetáveis estéreis são preparadas por incorporação do composto ativo na quantidade necessária no solvente apropriado com vários outros ingredientes enumerados acima, como requerido, seguido de esterilização por filtração. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injectáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são a secagem a vácuo e as técnicas de secagem por congelação, que produzem um pó do ingrediente ativo e mais qualquer ingrediente adicional desejado, presente nas soluções previamente esterilizadas por filtração.

Para a administração tópica, o presente composto pode ser aplicado na sua forma pura, isto é, quando são líquidos. No entanto, será geralmente desejável administrá-los na pele

como composições ou formulações, em combinação com um veículo dermatologicamente aceitável, que pode ser um sólido ou um líquido.

Os veículos sólidos úteis incluem sólidos finamente divididos, tais como talco, argila, celulose microcristalina, sílica, alumina e semelhantes. Os veículos líquidos úteis incluem água, hidroxialquilos ou glicóis ou misturas água-álcool/glicol, em que o composto presente pode ser dissolvido ou disperso em níveis eficazes, opcionalmente com o auxílio de tensioativos não tóxicos. Adjuvantes, tais como fragrâncias e agentes antimicrobianos adicionais podem ser adicionados para optimizar as propriedades para uma dada utilização. As composições líquidas resultantes podem ser aplicadas a partir de almofadas absorventes, usadas para impregnar ligaduras e outros pensos, ou pulverizadas sobre a área afetada, utilizando pulverizadores tipo bomba ou aerossol.

Os espessantes, tais como polímeros sintéticos, ácidos gordos, sais de ácidos gordos e ésteres, álcoois gordos, celuloses modificadas ou materiais minerais modificados, podem também ser empregues com veículos líquidos para formar pastas espalháveis, géis, pomadas, sabões e similares, para aplicação diretamente na pele do utilizador.

Exemplos de composições dermatológicas úteis que podem ser utilizadas para a entrega do composto à pele são conhecidos na técnica; por exemplo, ver Jacquet et al. (patente US No. 4608392), Geria (patente US No. 4992478), Smith et al. (patente US No. 4559157) e Wortzman (patente US No. 4820508).

As dosagens úteis dos compostos pode ser determinada por comparação da sua atividade *in vitro* e atividade *in vivo* em modelos animais. Métodos para a extrapolação de dosagens eficazes em ratinhos e outros animais para humanos são conhecidos na técnica; por exemplo, a patente US No. 4938949.

Geralmente, a concentração do(s) composto(s) numa composição líquida, tal como uma loção, será de cerca de 0,1-25% em peso, de preferência de cerca de 0,5-10% em peso. A concentração numa composição semi-sólida ou sólida, tal como um gel ou um pó será cerca de 0,1-5% em peso, preferencialmente cerca de 0,5-2,5% em peso.

A quantidade do composto, ou um sal ou derivado ativo, necessária para utilização em tratamento irá variar não apenas com o sal em particular selecionado, mas também com a via de administração, a natureza da condição a ser tratada e a idade e condição do paciente e será em última análise à discrição do médico assistente ou do clínico. Adicionalmente, a dosagem do composto varia dependendo da célula alvo, tumor, tecido, enxerto ou órgão.

A dose desejada pode ser convenientemente apresentada numa dose única ou como doses divididas administradas em intervalos apropriados, por exemplo, como duas, três, quatro ou mais sub-doses por dia. A própria sub-dose pode ser ainda dividida, por exemplo, num número de administrações discretas livremente espaçadas; tais como múltiplas inalações a partir de um insuflador ou por aplicação de uma pluralidade de gotas no olho.

Um regime de administração podem incluir a longo prazo, o tratamento diário. Por "longo prazo" significa pelo menos duas semanas e, de preferência, várias semanas, meses ou

anos de duração. As modificações necessárias nesta gama de dosagem podem ser determinadas por um perito na especialidade utilizando apenas experimentação de rotina, tendo em conta os ensinamentos aqui contidos. Ver Remington Pharmaceutical Sciences (Martin, EW, ed. 4), Mack Publishing Co., Easton, PA. A dosagem pode também ser ajustada pelo médico individual na eventualidade de qualquer complicação.

Exemplos

Exemplo 1: Imunização de lamas

Uma lama foi imunizado com a albumina do soro humano (HSA). O esquema de imunização está resumido na Tabela 1.

Exemplo 2: Repertório da clonagem

Os linfócitos do sangue periférico (PBLs) foram isolados por centrifugação em gradiente de densidade (Ficoll - Paque Bonés Amersham Biosciences). PBLs foram utilizados para extrair o ARN total (Chomczynski e Sacchi, 1987). O ADNc foi preparado em 100µg de ARN total com Transcriptase Reversa de MMLV (Gibco BRL) utilizando oligonucleótidos de oligo d(T). O cADN foi purificado por extração com fenol/clorofórmio, seguido de uma precipitação com etanol e subsequentemente utilizado como molde para amplificar o repertório de VHH.
Num primeiro PCR, o repertório de ambos os segmentos do genes do anticorpo convencional (1,6 kb) e de cadeia pesada (1,3 kb) foram amplificados utilizando um iniciador específico (5'-GGCTGAGCTCGGTGGTCCTGGCT-3') e o iniciador oligo d(T) (5'-AACTGGAAGAATTCGCGGCCGCAGGAATTTTTTTTTTTTTTTT-3'). Os

fragmentos de ADN resultantes foram separados por eletroforese em gel de agarose e o fragmento de 1,3 kb, que codifica para os segmentos de anticorpo de cadeia pesada foi purificado a partir do gel de agarose. O segundo PCR foi realizado utilizando uma mistura de iniciadores reversos FR1 e o mesmo iniciador *forward* oligo d(T). Os produtos de PCR foram digeridos com *Sfi*I (introduzida no iniciador FR1) e *BstE*II (que ocorre naturalmente em FR4). Seguidamente à eletroforese em gel, o fragmento de ADN de aproximadamente 400 pares de bases foi purificado a partir do gel e ligado no correspondente local de restrição do fagemídeo pAX004, de modo a obter uma biblioteca de VHHs clonados após a electroporação de *E. coli* TG1. A dimensão da biblioteca foi de 1,4 x 10^7 ufc e todos os clones continham a inserção no tamanho correto.

Exemplo 3: Resgate da biblioteca, preparação de fagos

A biblioteca foi cultivada a 37°C em 10 mL de meio 2xTY, contendo 2% de glucose, e 100µg/mL de ampicilina, até a DO600nm atingir 0,5. Os fagos M13KO7 (10^{12}) foram adicionados e a mistura foi incubada a 37°C durante 2 x 30 minutos, em primeiro lugar, sem agitação, em seguida, com agitação a 100 rpm. As células foram centrifugadas durante 10 minutos a 4500 rpm e à temperatura ambiente. O sedimento bacteriano foi ressuspenso em 50 mL de meio 2xTY contendo 100µg/mL de ampicilina e 25µg/mL de canamicina, e incubadas durante a noite a 37°C, com agitação vigorosa a 250 rpm. As culturas noturnas foram centrifugadas durante 15 minutos a 10.000 rpm, a 4°C. Os fagos foram precipitados com PEG (20% de polietilenoglicol e 1,5 M de NaCl) e centrifugados durante 30 minutos, a 10.000 rpm. O sedimento foi ressuspenso em 20mL de PBS. Os fagos foram precipitados com PEG e novamente centrifugados durante 30 minutos a 20.000

rpm e 4°C. O sedimento foi dissolvido em 5 mL de PBS-1% de caseína. Os fagos foram titulados por infeção de células TG1 a DO600nm=0,5 e plaqueamento em placas de agar LB contendo ampicilina 100µg/mL e 2% de glicose. O número de transformantes indica o número de fagos (=uff). Os fagos foram armazenados a -80°C com 15% de glicerol.

Exemplo 4: ELISA de fagos

Uma placa de microtitulação (Maxisorp) foi revestida durante a noite a 4°C com PBS-caseína a 1% ou com 5µg/mL de HSA (albumina do soro humano). A placa foi lavada 3 vezes com PBS-Tween (0,05% de Tween20) e bloqueadas durante 2 horas à temperatura ambiente com 200µL de PBS-caseína a 1%. A placa foi lavada cinco vezes com PBS-Tween. Os fagos foram preparados como descrito acima e aplicado aos poços em diluições sucessivas. As placas foram lavadas cinco vezes com PBS-Tween. Os fagos ligados foram detetados com um anticorpo monoclonal de ratinho anti-M13 conjugado com peroxidase de rábano (HRP), diluído 1/2000 em PBS. As placas foram lavadas cinco vezes com PBS-Tween. A coloração foi realizada com ABTS/H_2O_2 e os sinais foram medidos após 30 minutos, a 405 nm. Os resultados são mostrados na Figura 1 e indicam a presença de nanocorpos específicos para HSA na biblioteca.

Exemplo 5: Seleção: primeiro e segundo ciclo de bioseleção

Um poço numa placa de microtítulo foi revestido com 10µg/mL de albumina de soro de ratinho (MSA), ou com PBS contendo 1% de caseína. Após incubação durante a noite, a 4°C, os poços foram bloqueados com PBS contendo 1% de caseína, durante 3 horas, à temperatura ambiente (TA). 200 µL de fagos foram adicionados aos poços. Após 2 horas de

incubação à temperatura ambiente, os poços foram lavados 10 vezes com PBS-Tween e 10x com PBS. Os fagos ligados foram eluídos com 100µL de glicina 0,2 M, pH = 2,4. As eluições foram realizadas durante 20 minutos, à temperatura ambiente. Permitiu-se que os fagos eluídos infetassem as células em crescimento exponencial de *E. coli* TG1, e foram, em seguida, colocadas em placas de agar LB contendo 100µg/mL de ampicilina e 2% de glicose. Um segundo ciclo foi realizado com as mesmas condições que as descritas acima. Os resultados são resumidos na Tabela 2.

Exemplo 6: Rastreio de clones individuais após bioseleção

ELISA: Ligação à albumina de soro humana (HSA) e de albumina de soro do rato (MSA)

Uma única colónia foi utilizada para iniciar uma cultura durante a noite, em LB contendo glucose a 2% e 100µg/mL de ampicilina. Esta cultura durante a noite foi diluída 100 vezes em meio TB contendo 100µg/mL de ampicilina, e incubada a 37°C até a DO600nm=0,5. 1 mM de IPTG foi adicionado e a cultura foi incubada durante mais 3 horas a 37°C ou durante a noite a 28°C. As culturas foram centrifugadas durante 20 minutos a 10.000 rpm a 4°C. O sedimento foi congelado durante a noite ou durante 1 hora a -20°C. Em seguida, o sedimento foi descongelado à temperatura ambiente durante 40 minutos, re-suspenso em PBS e agitado em gelo durante 1 hora. A fração periplasmática foi isolada por centrifugação durante 20 minutos a 4°C a 20.000 rpm. O sobrenadante contendo o VHH foi usado para posterior análise.

A placa de microtitulação foi coberta com 5µg/mL de HSA, com 5µg/mL de albumina de soro de rato (MSA) ou com PBS-1% de caseína, durante a noite a 4°C. As placas foram bloqueadas durante duas horas à temperatura ambiente com

300µL de caseína a 1% em PBS. As placas foram lavadas três vezes com PBS-Tween. A fração periplasmática foi preparada para 23 clones individuais após o primeiro e segundo ciclos de seleção, e deixadas a ligar-se aos poços da placa de microtítulo. As placas foram lavadas seis vezes com PBS-Tween; posteriormente a ligação de nanocorpos foi detetada por incubação com anticorpo monoclonal anti-Histidina de rato Serotec MCA 1396 (diluição de 1/1000) em PBS durante 1 hora à TA, seguido por conjugado anti-ratinho fosfatase alcalina 1/2000 em PBS, também durante 1 hora à temperatura ambiente. A coloração foi realizada com o substrato PNPP (p-nitrofenil-fosfato, 2 mg/mL em dietanolamina 1 M, Mg_2SO_4 1 mM, pH 9,8) e os sinais foram medidos após 30 minutos a 405 nm. Os resultados encontram-se resumidos na Tabela 3.

Exemplo 7: Sequenciamento Padrão Hinfl

O PCR foi realizado em clones positivos após o segundo ciclo de prospeção, com um conjunto de iniciadores de ligação a uma sequência no vetor. O produto de PCR foi digerido com a enzima de restrição Hinfl e carregado num gel de agarose. Foram selecionados quatro clones com um padrão Hinfl diferente para posterior avaliação. Os clones foram sequenciados e os resultados estão resumidos na tabela 4 (SEQ ID NOS: 1, 2, 3 e 4).

Exemplo 8: Teste de reatividade cruzada com albumina de espécies diferentes

Foi executado um SDS-PAGE para o plasma (diluição 1/10) a partir de diferentes espécies (babuíno, porco, hamster, humano, rato e coelho) e transferidos sobre uma membrana de nitrocelulose. Os fagos foram preparados para os clones MSA 21, MSA 24, MSA 210, MSA 212 e um nanocorpo controlo tal

como descrito no Exemplo 3. Os fagos foram deixados a ligar à albumina do soro na nitrocelulose e os fagos não ligados foram lavados. A ligação foi detetada com um anticorpo policlonal anti-M13 acoplado a HRP. DAP foi utilizado como um substrato para a deteção. Os resultados são mostrados na Figura 2.

A partir desses resultados, podemos concluir que todos os 4 ligantes são reativos de forma cruzada com a albumina sérica entre porco, humano, rato (menos para MSA212) e hamster. MSA 21 também é reativo de forma cruzada com a albumina do soro de coelho. Com o nanocorpo irrelevante não foi observada ligação (não mostrado).

Como uma experiência de controlo, um SDS-PAGE foi executado com as diferentes amostras de plasma diluídas a 1/100 em PBS. O gel foi corado com coomassie. Pode-se concluir a partir da Figura 3, que os níveis de albumina em todas as amostras de plasma são elevadas, exceto para o plasma de coelho, com baixos níveis de albumina.

Exemplo 9: Expressão e purificação

O plasmídeo foi preparado para os ligantes e foi inserido em células WK6electrocompetentes. Uma única colónia foi utilizada para iniciar uma cultura durante a noite em LB contendo glucose a 2% e 100µg/mL de ampicilina. Esta cultura durante a noite foi diluída 100 vezes em 300 mL de meio TB contendo 100µg/mL de ampicilina, e incubadas a 37°C até a DO600nm =0,5. Foi adicionado IPTG 1mM e a cultura foi incubada durante mais 3 horas a 37°C ou durante a noite a 28°C.
As culturas foram centrifugadas durante 20 minutos a 10.000 rpm a 4°C. O sedimento foi congelado durante a noite ou durante 1 hora a -20°C. Em seguida, o sedimento foi

descongelado à temperatura ambiente durante 40 minutos, re-suspenso em 20mL de PBS e agitado em gelo durante 1 hora. A fração periplasmática foi isolada por centrifugação durante 20 minutos a 4°C, a 20000 rpm. O sobrenadante contendo o nanocorpo foi isolado em Ni-NTA e purificado até à homogeneidade.

Exemplo 10: ELISA em MSA dos nanocorpos purificados

Uma placa de microtítulo foi revestida com 5µg/mL de MSA durante a noite a 4°C. Após a lavagem, a placa foi bloqueada durante 2 horas à temperatura ambiente com PBS-1% de caseína. As amostras foram aplicadas em duplicado a partir de uma concentração de 2500nM a 1/3 de diluições e deixadas a ligar durante 2 horas à temperatura ambiente. Um soro de coelho anti-nanocorpo policlonal foi adicionado a 1/1000 (K208) durante uma hora à TA. A deteção foi realizada com anti-coelho fosfatase alcalina conjugada a 1/1000 e com coloração com PNPP como descrito no Exemplo 6. Os resultados são mostrados na Figura 4.

Exemplo 11: Construção de construções biespecíficas

O vetor pAX11 de produção em *E. coli* foi construído para permitir a clonagem em dois passos de VHH biespecífico ou bivalente (Figura 5).

O terminal carboxi de VHH foi clonado pela primeira vez com PstI e BstEII, enquanto no segundo passo o outro VHH foi inserido por SfiI e NotI, que não cortam no interior do primeiro fragmento de gene. O procedimento evita a execução de novos locais por amplificação e, assim, evita o risco de introdução de erros durante o PCR. A dobradiça média do lama foi usada como um ligante entre os nanocorpos. O VHH

contra TNF alfa humano foi clonado no terminal COOH de nanocorpos específicos MSA. As sequências estão resumidas na Tabela 4 (SEQ ID NOS: 5, 6, 7 e 8). O plasmídeo foi preparado e foi inserido em células WK6electrocompetentes. Uma única colónia foi utilizada para iniciar uma cultura durante a noite em LB contendo glucose a 2% e 100µg/mL de ampicilina. Esta cultura foi diluída 100 vezes em 300µL de meio TB contendo 100mg/mL de ampicilina e incubadas a 37°C até a DO600nm=0,5. 1 mM de IPTG foi adicionado e a cultura foi incubada durante mais 3 horas a 37°C.
As culturas foram centrifugadas durante 20 minutos a 10.000 rpm a 4°C. O sedimento foi congelado durante a noite a -20°C. Na manhã seguinte, o sedimento foi descongelado na câmara fria durante 40 minutos, re-suspenso em 20ML de PBS e agitado em gelo durante 1 hora. A fração periplasmática foi isolada por centrifugação durante 20 minutos a 4°C a 10.000 rpm. O sobrenadante foi carregado em Ni-NTA e purificado até à homogeneidade. As sequências são apresentadas na Tabela 4 (SEQ ID NOS: 5, 6, 7 e 8). Foi necessário um passo de purificação adicional para remover alguns produtos de degradação (5%) em filtração em gel.
Outro VHH biespecífico contra TNF-alfa (MP7 12b) encontra-se listado na Tabela 4 (SEQ ID NOS: 15, 16, 17 e 18).

Exemplo 12: Teste em sanduíche ELISA da construção biespecífica

A placa de microtitulação foi revestida com 5µg/mL de MSA durante noite a 4°C. As placas foram bloqueadas durante duas horas à temperatura ambiente com 300µl de caseína a 1% em PBS. As placas foram lavadas três vezes com PBS-Tween. A proteína purificada, para as construções biespecíficas foi deixada a ligar-se aos poços da placa de microtítulo, a uma concentração de 0,4, 0,5, 2,5 e 2,5µg/mL para MSA21, MSA24, MSA210 e MSA212, respetivamente. As placas foram lavadas

seis vezes com PBS-Tween, o TNF biotinilado foi adicionado a uma concentração de 10µg/mL e diluiu-se 3 vezes, foi deixado a ligar durante 2 horas à temperatura ambiente. A ligação foi detetada por incubação com o conjugado extravidina de rato e fosfatase alcalina (Sigma) 1/2000 em PBS, durante 1 hora a TA. A coloração foi realizada com o substrato PNPP (p-nitrofenil-fosfato, 2mg/mL em dietanolamina 1 M, Mg_2SO_4 1 mM, pH 9,8) e os sinais foram medidos após 30 minutos, a 405 nm. Os resultados são mostrados na Figura 6 e indicam que a construção biespecífica pode ligar-se os dois antigénios simultaneamente.

Exemplo 13: Determinação da afinidade de ligantes de albumina em BIACORE

As afinidades para albumina de rato foram determinadas em BIACORE por imobilização de albumina de rato num chip CM5 BIAcore utilizando acoplamento covalente EDC-NHS e estão resumidas na Tabela 5. Os resultados indicam que a afinidade para a albumina é retida na construção biespecífica.

Exemplo 14: Otimização de ELISA em plasma ou sangue

Experimentos farmacocinéticos foram iniciados para comparar a meia vida nos ratos do ligante TNF3E TNF-alfa com MSA21/VHH#3E e MSA24/VHH#3E. Portanto, a ELISA teve que ser otimizada para obter baixos valores de fundo quando as amostras estão no sangue ou no plasma. A placa de microtítulo foi revestida com neutravidina. Após incubação durante a noite a 4°C, as placas foram lavadas e bloqueadas durante 2 horas à temperatura ambiente com PBS-1% de caseína. 1µg/mL de TNF-alfa biotinilado foi deixado a

ligar-se durante 30 minutos à TA e a placa foi lavada. As amostras (monovalente VHH#3E e MSA21/VHH#3E) foram aplicadas a partir de uma concentração de 1µg/mL diluídas em PBS, 10% de plasma ou 10% de sangue e deixadas a ligar-se durante 2 horas. Após lavagem das placas, um anti-soro de coelho foi adicionado a uma diluição de 1/2000, quer para o reconhecimento da classe de cadeia pesada (K208) ou reconhecimento da classe convencional (URL49). Após 1 hora de incubação, as placas foram lavadas e um anti-coelho conjugado com fosfatase alcalina foi adicionado (Sigma) a uma diluição a 1/1000. Após 1 hora de incubação à TA, as placas foram lavadas e a ligação foi detetada com o substrato. Os resultados são mostrados na Figura 7. Os resultados mostram claramente que os valores de fundo, com os anti-soros de coelho (K20B e URL49) são muito baixos quando as amostras são diluídas em 10% de sangue ou 10% de plasma, em relação ao PBS. O anti-soro URL49 só reconhece o nanocorpo biespecífico MSA21NHH#3E e não VHH#3E monovalente, por conseguinte, este anti-soro pode ser utilizado para testar a integridade do nosso nanocorpo biespecífico após a administração em ratinhos.

Exemplo 15: Expressão à larga escala e purificação de VHH#3E, M5A21/VHH#3E e MSA24/VHH#3E para estudos farmacocinéticos em ratos

3L de cultura foi iniciados para TNF3E monovalente e para MSA21/VHH#3E ou MSA24/VHH#3E biespecíficos e purificados como descrito no Exemplo 11. Foi necessário um passo de purificação adicional para a remoção de endotoxinas. Assim, as amostras foram purificadas numa coluna de Polimixina (BIO-RAD). As amostras foram analisadas para a concentração de endotoxina bacteriana com o ensaio LAL (Limulus Amebocyte Lysate, Bio Whittaker). Os resultados são resumidos na Tabela 6.

Exemplo 16: Farmacocinética em ratos

9 ratos (OB57/BI6) para cada construção foram injetados por via intravenosa na cauda com 100µg de nanocorpo. O sangue foi retirado em pontos de tempo diferentes (3 ratinhos por ponto de tempo) e o soro foi preparado. As amostras foram analisadas por ELISA para a presença de nanocorpos monovalentes ou biespecíficos, tal como descrito no exemplo 14. K208 também foi comparada com URL49 para a construção biespecífica de modo a verificar a integridade da molécula. Os resultados são apresentados nas Figuras 8-11.

Podemos concluir a partir dos resultados que a meia vida do nanocorpo monovalente (40-45 minutos) é dramaticamente melhorada, fazendo um nanocorpo biespecífico com especificidade para albumina MSA2/NHH#3E e MSA24/VHH#3E (meia-vida 2,5 a 3 dias). O nanocorpo biespecífico MSA21/VHH#3E permanece intacto, mesmo após 19 dias em ratinhos, como mostrado no teste de ELISA com URL49 (Figura 11).

Exemplo 17: Extensão adicional da semi-vida de nanocorpos

De modo a aumentar a semi-vida de MSA21/TNF3E e MSA24/TNF3E ainda mais, um nanocorpo trivalente foi preparado por fusão da construção bivalente MSA21-MSA21 para o nanocorpo TNF3E específico para o alvo. O MSA21/MSA21/TNF3E resultante (Tabela 7 e SEQ ID NO: 9) foi testado *in vivo* de acordo com o método do Exemplo 16.

Exemplo 18: Imunização da lama002

Lama 1 foi imunizada com vWF. O esquema de imunização está resumido na Tabela 7.

Exemplo 19: Repertório de clonagem e preparação do fago

A biblioteca foi preparada como descrito no Exemplo 2. A dimensão da biblioteca foi de 1,4 x 10^7 ufc e >90% dos clones continham a inserção de tamanho correto. Os fagos foram preparados como descrito no Exemplo 3.

Exemplo 20: Seleção de ligantes para inibir a interação de vWF com colagénio: primeiro e segundo ciclo de prospeção

Um poço numa placa de microtitulação foi revestido com 2µg/mL de vWF ou com PBS contendo 1% de caseína. Após incubação durante a noite a 4°C, os poços foram bloqueados com PBS contendo 1% de caseína, durante 3 horas à temperatura ambiente. Foi adicionado 200µL de fagos aos poços. Após 2 horas de incubação à temperatura ambiente, os poços foram lavados 10X com PBS-Tween e 10x com PBS. Os fagos foram especificamente eluídos com 100mL de 100µg/mL de colagénio do tipo III. As eluições foram realizadas durante a noite à temperatura ambiente. Permitiu-se que os fagos eluídos infetassem as células TG1 em crescimento exponencial e, em seguida, foram colocadas em placas de agar LB contendo 100µg/mL de ampicilina e 2% de glicose. Esta experiência foi repetida para um segundo ciclo de prospeção, sob as mesmas condições que as descritas acima. Os resultados obtidos a partir da seleção são apresentados nas Tabelas 8 e 9.

Exemplo 21: Caracterização funcional de ligantes vWF: Inibição da ligação de vWF ao colagénio por VHH

Uma placa de microtitulação foi revestida durante a noite a 4°C com colagénio de tipo III em 25µg/mL em PBS. A placa foi lavada cinco vezes com PBS-Tween e bloqueada durante 2

horas à temperatura ambiente com PBS contendo 1% de caseína. A placa foi lavada cinco vezes com PBS-tween. 100 µL de 2µg/mL de vWF (vWF é pré-incubada a 37'C durante 15 minutos) foi misturada com 20µL de extrato periplasmático contendo um anticorpo de VHH (descrito no Exemplo 6) e incubou-se durante 90 minutos à temperatura ambiente nos poços da placa de microtitulação. A placa foi lavada cinco vezes com PBS-Tween. Um anticorpo monoclonal anti-vWF-HRP (DAKO) foi diluído 3.000 vezes em PBS e incubadas durante 1 hora. A placa foi lavada cinco vezes com PBS-Tween e a ligação vWF foi detetada com ABTS/H_2O_2. Os sinais foram medidos após 30 minutos a 405 nm. Os resultados são apresentados na Tabela 10, que mostra que os inibidores são obtidos após o primeiro e segundo ciclo de separação.

Exemplo 22: Expressão e purificação de VHH

A proteína foi preparada e purificada como descrito no Exemplo 9.

Exemplo 23: ELISA: ligação a vWF

Uma placa de microtitulação foi revestida com 2µg/mL de vWF, durante a noite a 4°C. As placas foram bloqueadas durante duas horas à temperatura ambiente com 300 µL de caseína a 1% em PBS. As placas foram lavadas três vezes com PBS-Tween. As série de diluições das amostras purificadas foram incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente. As placas foram lavadas seis vezes com PBS-Tween, após a qual a ligação de VHH foi detetada por incubação com anticorpo de ratinho anti-myc mAB 1/2000 em PBS durante 1 hora à TA, seguido pelo conjugado anti-ratinho-HRP 1/1000 em PBS, também durante 1 hora à TA. A coloração foi realizada com o substrato ABTS/H_2O_2 e os sinais foram medidos após 30

minutos a 405 nm. A ligação em função da concentração de VHH purificada está indicada na Figura 12.

Exemplo 24: Inibição de ELISA com VHH purificado

A inibição de ELISA foi realizada como descrito no Exemplo 20, mas com concentrações decrescentes de VHH e com plasma humano a uma diluição de 1/60, em vez de ser com o vWF purificado. Os resultados estão representados na Figura 13. A concentração do VHH resultante em 50% de inibição (IC50) é dada na tabela 10.

Exemplo 25: Construção e sequência das construções biespecíficas

As construções biespecíficas foram preparadas com o primeiro VHH específico para albumina (MSA21) e o segundo VHH específico para vWF. As construções foram realizadas como descrito no Exemplo 11. As sequências estão apresentadas na Tabela 4 (SEQ ID NOS: 19 a 21).

Exemplo 26: Expressão e purificação de construções biespecíficas

A proteína foi expressa e purificada como descrito no Exemplo 9. Uma etapa de purificação adicional foi necessária em Superdex 7,5 para a remoção de algum produto monovalente de degradação (5-10%).

Exemplo 27: Funcionalidade de ambos os VHHs na construção biespecífica

Uma placa de microtitulação foi revestida com 5µg/mL de albumina de soro de rato durante a noite a 4°C. Após

lavagem da placa, os poços foram bloqueados durante 2 horas com PBS-1% de caseína. As proteínas biespecíficas foram deixadas a ligar aos poços durante 2 horas à temperatura ambiente. Após a lavagem, plasma humano, de cão e de porco foi adicionado em diferentes diluições e deixado a ligar durante 2 horas à temperatura ambiente. A ligação do vWF foi detetada com o anticorpo anti-vWF-HRP de DAKO a 1/3000 de diluição. A coloração foi realizada com ABTS/H_2O_2. Os resultados são mostrados na Figura 14 e indicam que a funcionalidade de ambos os VHHs é retida na construção biespecífica.

Exemplo 28: Inibição da ligação do vWF ao colagénio pelas construções biespecíficas como comparado com os VHHs monovalentes

A inibição para a ligação do vWF ao colagénio foi testada para monovalente, em comparação com as construções biespecíficas como descritos no Exemplo 20. Os valores de IC50 encontram-se resumidos na Tabela 11. Os resultados indicam que as propriedades inibitórias de VHH são mantidas na construção biespecífica.

Exemplo 29: Construção de uma construção biespecífica que contém um fragmento VHH-CDR3 fundido com um VHH de albumina anti-soro

A porção funcional, a região CDR3 de MP2F6SR, foi amplificada utilizando um iniciador *forward* localizado na região da estrutura 4 (F6 CRD3 *forward*: CTGGCCCCAGAAGTCATACC) e um iniciador reverso localizado na região da estrutura 3 (F6 CDR3 iniciador reverso: TGTGCATGTGCAGCAAACC).

De modo a fundir o fragmento de CDR-3 com VHH MSA-21 de albumina anti-soro, um segundo ciclo de amplificação por PCR foi realizado com os seguintes iniciadores:

F6 CDR3 iniciador reverso Sfi1:
GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCTGTGCATGTGCAGCAAACC
F6 CDR3 iniciador *forward* Not1:
GTCCTCGCAACTGCGCGGCGGCCTGGCCCCAGAAGTCATACC

As reações PCR foram realizadas em 50mL de volume de reação utilizando 50pmol de cada iniciador. As condições de reação para o PCR primário foram de 11 min a 94°C, seguido por 30/60/120 segundos a 94/55/72°C durante 30 ciclos, e 5 min a 72°C. Todas as reações foram realizadas com $MgCl_2$ 2,5mM, dNTPs 200mM e 1,25U ADN Polimerase AmpliTaq God (Roche Diagnostics, Bruxelas, Bélgica).

Após a clivagem do gene VHH de clones MSA com as enzimas de restrição Pst1/BstEII, os produtos digeridos foram clonados em pAX11 para se obter clones com um VHH no terminal C do local de multiclonagem. Os clones foram analisados por PCR utilizando os iniciadores do vetor base. A partir de clones que produzem um produto de 650pb, o ADN foi preparado e usado como vetor aceitador para clonar o CDR3 de MP2F6SR após a clivagem do produto de PCR com as enzimas de restrição Sfi1/Not1 de modo a permitir a expressão do terminal N de CDR3 em fusão com um MSA VHH.

Exemplo 30: Cálculo de homologias entre os anticorpos de domínio único anti-alvo da invenção

O grau de homologia de sequência de aminoácidos entre os anticorpos de domínio único anti-alvo da invenção foi calculado utilizando o *Bioedit Sequence Alignment Editor*.

Os cálculos indicam a percentagem de resíduos idênticos entre todas as sequências que estão alinhados por ClustalW. (Thompson, JD, Higgins, DG e Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: Melhorar a sensibilidade do alinhamento progressivo múltiplo de sequências através de ponderação da sequência, posição especifica de gap e escolha da matriz de peso. (Nucleic Acids Research, submitted, junho 1994). A Tabela 12 indica a homologia entre a fração de VHHs de albumina anti-soro da invenção. A Tabela 13 indica a homologia entre a fração de VHHs anti-TNF-alfa da invenção. A Tabela 14 indica a percentagem de homologia entre VHHs anti-IFN-gama da invenção. A Tabela 15 indica a homologia entre a fração de VHHs anti-vWF da invenção.

Tabela 1: Esquema de imunização de acordo com o Exemplo 1

Dia de imunização	**HSA Lama006**
0	100 µg
7	100 µg
14	50 µg
21	50 µg
28	50 µg
35	50 µg

Tabela 2: Resultados após um e dois ciclos de seleção em albumina de soro de rato, como descrito no exemplo 5.

	Primeiro ciclo	**Segundo ciclo**
Uff albumina de soro de rato	$2,5 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$
Uff caseína	5×10^3	$2,5 \times 10^3$
enriquecimento	5.000	10.000

Tabela 3: Os clones foram selecionados, após um e dois ciclos de seleção e os extratos periplasmáticos foram preparados. Estes clones foram analisados por ELISA quanto à ligação a albumina humana e de rato, tal como descrito no Exemplo 6.

	Primeiro ciclo	**Segundo ciclo**
ELISA albumina de soro de rato	1/16	15/16
ELISA albumina de soro humana	1/16	15/16
ELISA caseína	0/16	0/16

Tabela 4: Listagem de sequências

NOME	**SEQ ID**	**SEQUÊNCIA**
		Albumina de soro anti-rato
MSA21	1	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVEWVSGISS LGDSTLYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLNPGG QGTQVTVSS
MSA24	2	QVQLQESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRNFGMSWVRQAPGKEPEWVSSISG SGSNTIYADSVKDRFTISRDNAKSTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSS QGTQVTVSS
MSA210	3	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAISS
		DSGTKNYADSVKGRFTISRDNAKKMLFLQMNSLRPEDTAVYYCVIGRGSPSSQ GTQVTVSS
MSA212	4	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAISA DGSDKRYADSVKGRFTISRDNGKKMLTLDMNSLKPEDTAVYYCVIGRGSPASQ GTQVTVSS
MSAcl6	28	AVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCVVSGTTFSSAAMGWFRQAPGKEREFVGAIKW SGTSTYYTDSVKGRFTISRDNVKNTVYLQMNNLKPEDTGVYTCAADRDRYRDR MGPMTTTDFRFWGQGTQVTVSS
MSAcl1	29	

NOME	SEQ ID	SEQUÊNCIA
		Albumina de soro anti-rato
2		QVKLEESGGGLVQTGGSLRLSCAASGRTFSSFAMGWFRQAPGREREFVASIGS SGITTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGLCYCAVNRYGIPYR SGTQYQNWGQGTQVTVSS
MSAcl10	30	EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFNDYAMGWYRQAPGKERDMVATISI GGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAIYYCVAHRQTVVRGP YLLWGQGTQVTVSS
MSAcl14	31	QVQLVESGGKLVQAGGSLRLSCAASGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVAGSGR SNSYNYYSDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAASTNLWPRD RNLYAYWGQGTQVTVSS
MSAcl16	32	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSLGIYRMGWFRQVPGKEREFVAAISW SGGTTRYLDSVKGRFTISRDSTKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAVDSSGRLYW TLSTSYDYWGQGTQVTVSS
MSAcl19	33	QVQLVEFGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSLGIYKMAWFRQVPGKEREFVAAISW SGGTTRYIDSVKGRFTLSRDNTKNMVYLQMNSLKPDDTAVYYCAVDSSGRLYW TLSTSYDYWGQGTQVTVSS
MSAcl5	34	EVQLVESGGGLVQAGGSLSLSCAASGRTFSPYTMGWFRQAPGKEREFLAGVTW SGSSTFYGDSVKGRFTASRDSAKNTVTLEMNSLNPEDTAVYYCAAAYGGGLYR DPRSYDYWGRGTQVTVSS
MScl11	35	AVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTLDAWPIAWFRQAPGKEREGVSCIRD GTTYYADSVKGRFTISSDNANNTVYLQTNSLKPEDTAVYYCAAPSGPATGSSH TFGIYWNLRDDYDNWGQGTQVTVSS
MSAcl15	36	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDHYTIGWFRQVPGKEREGVSCISS SDGSTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNTLEPDDTAVYYCAAGGLLLRVE ELQASDYDYWGQGIQVTVSS
MSAcl8	37	AVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEREGVACISN SDGSTYYGDSVKGRFTISRDNAKTTVYLQMNSLKPEDTAVYYCATADRHYSAS HHPFADFAFNSWGQGTQVTVSS
MSAcl7	38	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAYGLTFWRAAMAWFRRAPGKERELVVARNW GDGSTRYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRTYGSAT YDIWGQGTQVTVSS
MSAcl2	39	

NOME	SEQ ID	SEQUÊNCIA
		Albumina de soro anti-rato
0		EVQLVESGGGLVQDGGSLRLSCIFSGRTFANYAMGWFRQAPGKEREFVAAINR NGGTTNYADALKGRFTISRDNTKNTAFLQMNSLKPDDTAVYYCAAREWPFSTI PSGWRYWGQGTQVTVSS
MsAcl4	40	DVQLVESGGGWVQPGGSLRLSCAASGPTASSHAIGWFRQAPGKEREFVVGINR GGVTRDYADSVKGRFAVSRDNVKNTVYLQMNRLKPEDSAIYICAARPEYSFTA MSKGDMDYWGKGTLVTVSS
		Albumina de soro anti-rato /anti TNF-alfa
MSA21/ VHH#3E	5	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVEWVSGISS LGDSTLYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLNPGG QGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYT YTIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIAKNTVDLTMNNLEPE
		DTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
MSA24/ VHH#3E	6	QVQLQESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRNFGMSWVRQAPGKEPEWVSSISG SGSNTIYADSVKDRFTISRDNAKSTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSS QGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYT YTIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIAKNTVDLTMNNLEPE DTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
MSA210 / VHH#3E	7	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAISS DSGTKNYADSVKGRFTISRDNAKKMLFLQMNSLRPEDTAVYYCVIGRGSPSSQ GTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTY TIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIAKNTVDLTMNNLEPED TAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
MSA212 / VHH#3E	8	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAISA DGSDKRYADSVKGRFTISRDNGKKMLTLDMNSLKPEDTAVYYCVIGRGSPASQ GTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTY TIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIAKNTVDLTMNNLEPED TAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
MSA21/ MSA21/ VHH#3E	9	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVEWVSGISS LGDSTLYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLNPGG QGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRF GMTWVRQAPGKGVEWVSGISSLGDSTLYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNS LKPEDTAVYYCTIGGSLNPGGQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQESGGGL VQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTY YADSVKGRFAISRDIAKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYN YWGQGTQVTVSS

NOME	SEQ ID	SEQUÊNCIA
		Albumina de soro anti-rato
MSA210 /VHH#1	10	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAISS DSGTKNYADSVKGRFTISRDNAKKMLFLQMNSLRPEDTAVYYCVIGRGSPSSQ GTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFDFSVSW MYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYVDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMDSL IPEDTALYYCARSPSGSFRGQGTQVTVSS
MSA-210 /VHH#9	11	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAISS DSGTKNYADSVKGRFTISRDNAKKMLFLQMNSLRPEDTAVYYCVIGRGSPSSQ GTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFRVNA MGWYRQVPGNQREFVAIITSGDNLNYADAVKGRFTISTDNVKKTVYLQMNVLK PEDTAVYYCNAILQTSRWSIPSNYWGQGTQVTVSS
MSA210 /VHH#1 3	12	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAISS DSGTKNYADSVKGRFTISRDNAKKMLFLQMNSLRPEDTAVYYCVIGRGSPSSQ GTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDYW MYWVRQAPGKGLEWVSTVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDNAKYTLYLQMNSL KSEDTAVYYCTKVVPPYSDDSRTNADWGQGTQVTVSS
MSA210 /VHH#2	13	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAISS DSGTKNYADSVKGRFTISRDNAKKMLFLQMNSLRPEDTAVYYCVIGRGSPSSQ GTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHS GYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIAKNTVDL TMNNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
MSA210 /VHH#3	14	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAISS DSGTKNYADSVKGRFTISRDNAKKMLFLQMNSLRPEDTAVYYCVIGRGSPSSQ GTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRTFSAHS VYTMGWFRQAPGKEREFVARIYWSSANTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLLM NSLKPEDTAVYYCAARDGIPTSRTVGSYNYWGQGTQVTVSS
MEA21/ VHH#12	15	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVEWVSGISS LGDSTLYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLNPGG
B		QGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFEFENH WMYWVRQAPGKGLEWVSTVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDNAKYTLYLQMNS LKSEDTAVYYCTKVLPPYSDDSRTNADWGQGTQVTVSS
MSA24/ VHH#12 B	16	QVQLQESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRNFGMSWVRQAPGKEPEWVSSISG SGSNTIYADSVKDRFTISRDNAKSTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSS QGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFEFENH WMYWVRQAPGKGLEWVSTVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDNAKYTLYLQMNS LKSEDTAVYYCTKVLPPYSDDSRTNADWGQGTQVTVSS

NOME	SEQ ID	SEQUÊNCIA
		Albumina de soro anti-rato
MSA210 /VHH#1 2B	17	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAISS DSGTKNYADSVKGRFTISRDNAKKMLFLQMNSLRPEDTAVYYCVIGRGSPSSQ GTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFEFENHW MYWVRQAPGKGLEWVSTVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDNAKYTLYLQMNSL KSEDTAVYYCTKVLPPYSDDSRTNADWGQGTQVTVSS
MSA212 /VHH#1 2B	18	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAISA DGSDKRYADSVKGRFTISRDNGKKMLTLDMNSLKPEDTAVYYCVIGRGSPASQ GTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFEFENHW MYWVRQAPGKGLEWVSTVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDNAKYTLYLQMNSL KSEDTAVYYCTKVLPPYSDDSRTNADWGQGTQVTVSS
		Albumina de soro anti-rato/anti-vWF
MSA21/AM-2-75	19	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVEWVSGIS SLGDSTLYADSVKGRFTSRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLNPG GQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFN WYPMSWVRQAPGKGLEWVSTISTYGEPRYADSVKADSPSSETTPTTRCICNE QPETEDTAVYYCARGAGTSSYLPQRGNWDQGTQVTVSS
MSA21/AM-4-15-3	20	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVEWVSGIS SLGDSTLYADSVKGRFTSRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLNPG GQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQDSGGGLVQPGGSLRLACAASGSIFS INSMGWYRQAPGKQRELVAHALADGSASYRDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCNTVPSSVTKGYWGQGTQVTVSS
MSA21/22-4L-16	21	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVEWVSGIS SLGDSTLYADSVKGRFTSRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLNPG GQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFS SYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCVADTGGISWIRTQGYNYWGQGTQVTVSS
		Albumina de soro anti-rato/anti-IgE
MSA 21/ EV 2H11	22	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVEW VSGISSLGDSTLYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVY YCTIGGSLNPGGQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQESGGGLVQA GGSLRLSCAASGVTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVASITWTGTGTYYA DSVKGRFTISRDHAGTTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAVDRRSSTYYLM KGEYDYRGRGTQVTVSS
MSA 24/ Ev 2H11	23	

NOME	SEQ ID	SEQUÊNCIA
		Albumina de soro anti-rato
		QVQLQESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRNFGMSWVRQAPGKEPEW VSSISGSGSNTIYADSVKDRFTISRDNAKSTLYLQMNSLKPEDTAVY YCTIGGSLSRSSQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQESGGGLVQA GGSLRLSCAASGVTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVASITWTGTGTYYA DSVKGRFTISRDHAGTTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAVDRRSSTYYLM KGEYDYRGRGTQVTVSS
MSA	24	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW
210/ EV 2H11		VSAISSDSGTKNYADSVKGRFTISRDNAKKMLFLQMNSLRPEDTAVY YCVIGRGSPSSQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQESGGGLVQAG GSLRLSCAASGVTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVASITWTGTGTYYAD SVKGRFTISRDHAGTTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAVDRRSSTYYLMK GEYDYRGRGTQVTVSS
		Albumina de soro anti-rato/anti-IFN-gama
MSA 21/ MP2F6SR	25	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVEW VSGISSLGDSTLYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVY YCTIGGSLNPGGQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVKLEESGGGLVQA GGSLRLSCAASGRTFNNYNMGWFRQAPGKEREFVAAISWNGGSTYYD DSVKGRFTISRDNANNLVYLQMNSLNFEDTAVYYCACAANPYGIPQY RENRYDFWGQGTQVTVSS
MSA 24/ MP2F1BR	26	QVQLQESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRNFGMSWVRQAPGKEPEW VSSISGSGSNTIYADSVKDRFTISRDNAKSTLYLQMNSLKPEDTAVY YCTIGGSLSRSSQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAAVQLVESGGGLVQT GDSLRLSCVASGGTFSRYAMGWFRQAPGKEREFVARIGYSGRSISYA TSVEGRFAISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCASLVSGTLYQAD YWGQGTQVTVSS
MSA 210/ MP3H6SRA	27	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW VSAISSDSGTKNYADSVKGRFTISRDNAKKMLFLQMNSLRPEDTAVY YCVIGRGSPSSQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQESGGGLVQAG GSLRLSCAASGRTFSIYNMGWFRQAPGKEREFVAGISWNGGSIYYTS SVEGRFTISRDNAENTVYLQMNSLKPEDTGVYYCASKGRPYGVPSPR QGDYDYWGQGT QVTVSS

Tabela 5: Afinidades (koff, kon e KD) para ligantes de albumina como determinado por BIACORE e como descrito no Exemplo 13.

	K_{on} (10^5 $M^{-1}s^{-1}$)	K_{off} (10^{-5} s^{-1})	K_D [nM]

	K_{on} (10^5 $M^{-1}s^{-1}$)	K_{off} (10^{-5} s^{-1})	K_D [nM]
MSA21	3,4	420	12
MSA24	6,4	1800	28
MSA212	3,7	9330	250
MSA21/TNF3E	2,3	370	16
MSA24/TNF3E	3,1	630	20
MSA212/TNF3E	0,42	490	120

Tabela 6: Resultados do ensaio LAL, para nanocorpos monovalente e biespecíficos depois da purificação sobre polimixina, como descrito no Exemplo 15.

	TNF3E Monovalente	**MSA21/TNF3E Biespecífico**	**MSA24/TNF3E Biespecífico**
Endotoxina unidades/mg de VHH	0,13 Eu/mg	0,75 Eu/mg	2.8 Eu/mg

Tabela 7: Esquema de imunização utilizado para lama 002 de acordo com o Exemplo 17.

Lama002 Dia da imunização	**vWF**
0	100 µg
7	100 µg
14	50 µg
21	50 µg
28	50 µg
35	50 µg

Tabela 8: Unidades formadoras de placa (ufp), após um ou dois ciclos de seleção em vWF, em comparação com PBS-

caseína, como descrito no exemplo 19. Ufp vWF (antigénio) dividido por ufp caseína (uma ligação específica) = enriquecimento.

Ciclo	**Ufp vWF**	**Ufp caseína**	**Enriquecimento**
Primeiro	1×10^{7}	$2,5 \times 10^{5}$	40
Segundo	5×10^{8}	$2,5 \times 10^{6}$	200

Tabela 9: Número de inibidores versus o número de clones testados após o primeiro e segundo ciclo de seleção, tal como descrito no Exemplo 20.

Ciclo	**Número de inibidores versus número de clones testados**
First	4/800
Second	4/96

Tabela 10: Concentração de VHH (nM) necessária para inibir a ligação de vWF ao colagénio em 50% (IC50), como descrito no Exemplo 23.

Nome VHH	**IC50 (nM)**
22-2L-34	10
T76	30
A-4-15-3	2
22-4L-16	0,5
C37	2
AM-2-75	2

Tabela 11: Valores de IC50 para nanocorpos biespecíficos contra a albumina e contra o vWF, como descrito no Exemplo 28.

	IC50 (ng/mL)
AM-2-75	100
MSA21/AM-2-75	60
AM-4-15-3	155
MSA21/AM-4-15.3	245
22-4L-16	100
MSA21/22-4L-16	140

Tabela 12: Homologias fracionárias entre as sequências de aminoácidos de VHHs anti-rato de albumina de soro, da invenção.

SEQ	MSA21	MSA24	MSA210	MSA212
MSA21	1,000	0,834	0,800	0,782
MSA24	---	1,000	0,782	0,791
MSA210	---	---	1,000	0,903
MSA212	---	---	---	1,000

Tabela 13: Homologias fracionárias entre VHHs anti-TNF-alfa da invenção.

SEQ	VHH#1A	VHH#7B	VHH#2B	VHH#3E	VHH#3G	VHH#10A	VHH#2G	VHH#1F	VHH#9C	VHH#11E	VHH#10C	VHH#4B	VHH#10D	VHH#12B	VHH#9E	VHH#3F
VHH#1A	1.000	0.601	0.754	0.596	0.622	0.609	0.682	0.629	0.609	0.601	0.614	0.818	0.642	0.747	0.596	0.604
VHH#7B	—	1.000	0.604	0.635	0.645	0.943	0.653	0.616	0.933	0.933	0.719	0.593	0.614	0.620	0.616	0.624
VHH#2B	—	—	1.000	0.620	0.645	0.611	0.682	0.661	0.629	0.620	0.637	0.796	0.634	0.951	0.620	0.645
VHH#3E	—	—	—	1.000	0.675	0.641	0.713	0.689	0.620	0.643	0.612	0.604	0.648	0.596	0.674	0.682
VHH#3G	—	—	—	—	1.000	0.651	0.779	0.740	0.637	0.637	0.653	0.645	0.689	0.622	0.708	0.716
VHH#10A	—	—	—	—	—	1.000	0.658	0.614	0.935	0.935	0.725	0.592	0.612	0.626	0.622	0.637
VHH#2G	—	—	—	—	—	—	1.000	0.741	0.653	0.669	0.685	0.666	0.746	0.650	0.701	0.717
VHH#1F	—	—	—	—	—	—	—	1.000	0.616	0.616	0.664	0.661	0.714	0.645	0.709	0.717
VHH#9C	—	—	—	—	—	—	—	—	1.000	0.941	0.743	0.601	0.622	0.645	0.600	0.616
VHH#11E	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.000	0.719	0.601	0.622	0.637	0.608	0.624
VHH#10C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.000	0.650	0.606	0.637	0.600	0.632
VHH#4B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.000	0.611	0.796	0.588	0.629
VHH#10D	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.000	0.619	0.674	0.674
VHH#12B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.000	0.604	0.637
VHH#9E	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.000	0.654
VHH#3F																1.000

Tabela 14: Percentagem de homologias entre VHHs anti-IFN-gama da invenção.

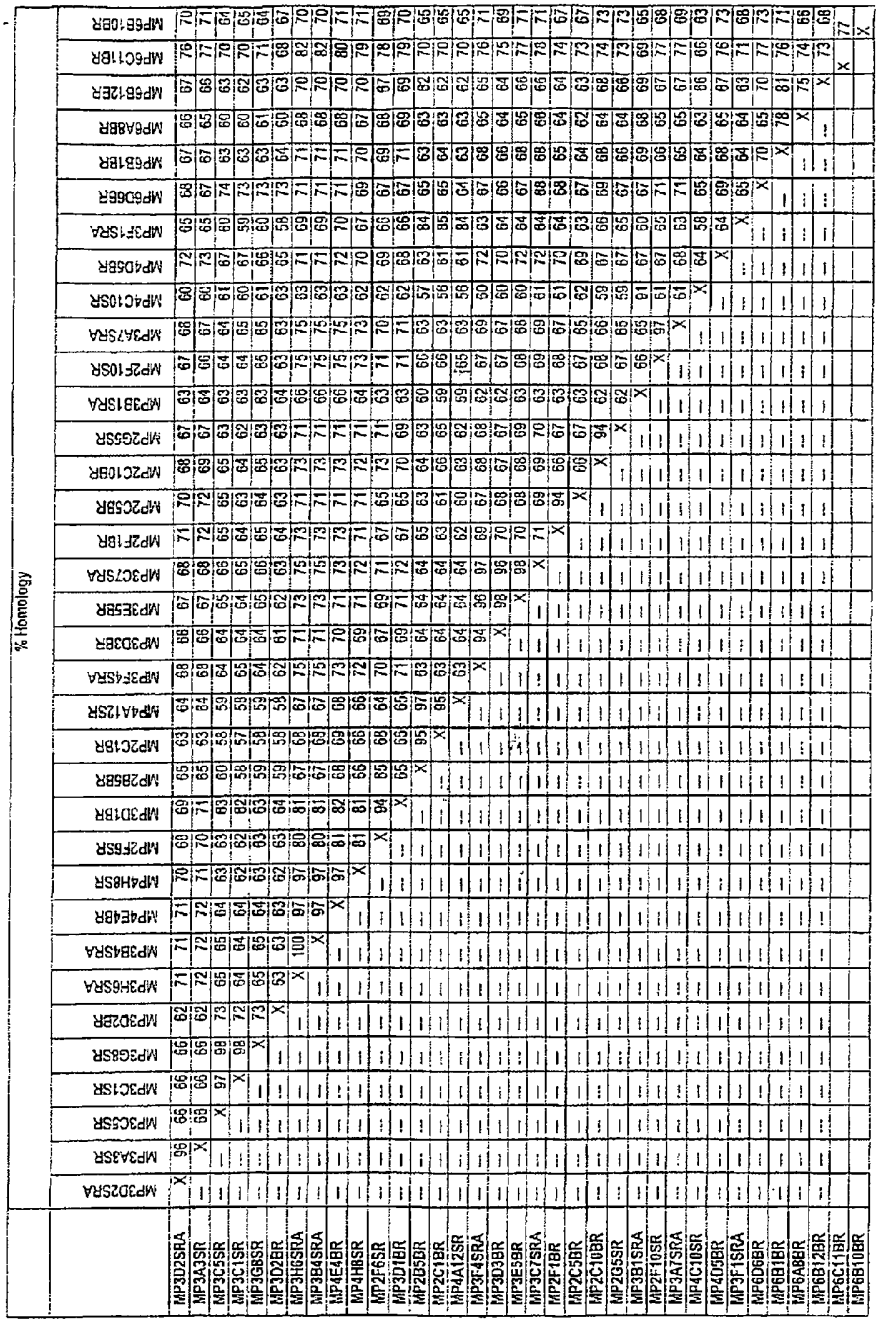


Tabela 15: Homologias fracionárias entre VHHs anti-vWF da invenção.

SEQ	C37	C37-hum	AM2-75	22-2L-34	22-4L-16	T76	AM-4-15-3	A50	I53	Z29	M53	2A1-4L-79	2A1-4L-129	2A1-4L-34	2A1-4L-78	2LA1-15	3P1-31	3L-41	3P2-31	C37-3	C37-4	C37-8	C37-10
C37	1.00	0.95	0.99	0.59	0.68	0.63	0.63	0.65	0.59	0.57	0.59	0.57	0.61	0.59	0.62	0.61	0.66	0.63	0.60	0.97	0.96	0.93	0.91
C37-hum	—	1.00	0.94	0.59	0.68	0.63	0.63	0.65	0.58	0.57	0.60	0.59	0.61	0.59	0.62	0.62	0.66	0.63	0.59	0.97	0.98	0.98	0.96
AM-2-75	—	—	1.00	0.60	0.68	0.64	0.64	0.66	0.59	0.57	0.60	0.58	0.62	0.60	0.62	0.62	0.67	0.64	0.60	0.96	0.95	0.92	0.92
22-2L-34	—	—	—	1.00	0.77	0.61	0.64	0.71	0.66	0.64	0.64	0.67	0.70	0.70	0.65	0.65	0.66	0.63	0.63	0.59	0.59	0.58	0.58
22-4L-16	—	—	—	—	1.00	0.71	0.70	0.80	0.70	0.73	0.69	0.70	0.73	0.72	0.70	0.68	0.73	0.69	0.71	0.67	0.67	0.68	0.68
T76	—	—	—	—	—	1.00	0.77	0.68	0.59	0.62	0.61	0.61	0.62	0.61	0.65	0.60	0.69	0.65	0.65	0.62	0.62	0.61	0.61
AM-4-15-3	—	—	—	—	—	—	1.00	0.66	0.65	0.61	0.62	0.63	0.65	0.65	0.62	0.67	0.69	0.63	0.62	0.63	0.63	0.62	0.62
A50	—	—	—	—	—	—	—	1.00	0.67	0.70	0.66	0.67	0.70	0.67	0.68	0.68	0.69	0.67	0.69	0.64	0.64	0.64	0.64
I53	—	—	—	—	—	—	—	—	1.00	0.63	0.69	0.70	0.72	0.72	0.84	0.65	0.66	0.65	0.63	0.58	0.58	0.56	0.56
Z29	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.00	0.64	0.64	0.67	0.68	0.71	0.64	0.63	0.61	0.66	0.56	0.56	0.56	0.56
M53	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.00	0.70	0.70	0.72	0.67	0.60	0.64	0.64	0.69	0.59	0.59	0.58	0.60
2A1-4L-79	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.00	0.88	0.85	0.66	0.63	0.64	0.62	0.62	0.57	0.57	0.57	0.57
2A1-4L-129	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.00	0.88	0.70	0.65	0.67	0.64	0.64	0.61	0.61	0.60	0.60
2A1-4L-34	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.00	0.66	0.64	0.65	0.64	0.62	0.58	0.58	0.58	0.58
2A1-4L-78	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.00	0.63	0.65	0.62	0.70	0.62	0.62	0.60	0.60
2LA1-15	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.00	0.65	0.62	0.60	0.60	0.61	0.60	0.60
3P1-31	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.00	0.89	0.67	0.65	0.65	0.64	0.64
3L-41	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.00	0.65	0.63	0.63	0.62	0.62
3P2-31	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.00	0.58	0.58	0.57	0.57
C37-3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.00	0.99	0.95	0.94
C37-4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.00	0.96	0.95
C37-8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.00	0.98
C37-10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.00

Lisboa, 05 de Junho de 2014

REIVINDICAÇÕES

1. Uma construção polipeptídica compreendendo:

   - pelo menos um anticorpo de domínio único dirigido contra um alvo terapêutico e/ou de diagnóstico, e
   - pelo menos um anticorpo de domínio único dirigido contra a albumina de soro humano, que é

   a) SEQ ID NO: 1, ou
   b) um anticorpo VHHs humanizado *Camelidae*, que é uma sequência homóloga que apresenta mais de 90% de identidade da sequência com uma sequência representada por SEQ ID NO: 1, e que é reativa de forma cruzada entre a albumina de soro de porco, humana, ratinho, hamster e de coelho.

2. Uma construção polipeptídica de acordo com a reivindicação 1, em que:
   - o número de anticorpos de domínio único anti-alvo é, pelo menos, dois, e
   - pelo menos dois anticorpos de domínio único anti-alvo não compartilham a mesma sequência, ou todos os anticorpos de domínio único anti-alvo partilham a mesma sequência.

3. Uma construção polipeptídica de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que o pelo menos um anticorpo de domínio único, que é um anticorpo VHHs humanizado *Camelidae*, e que é uma sequência homóloga que apresenta mais de 90% de identidade de sequência com uma sequência representada por SEQ ID NO: 1, é capaz

de se ligar ao seu alvo com uma afinidade de mais do que 10^{-6} M.

4. Uma construção polipeptídica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o alvo é TNF-alfa.

5. Uma construção polipeptídica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o alvo é vWF.

6. Um ácido nucleico que codifica uma construção polipeptídica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5.

Lisboa, 05 de Junho de 2014

Figura 1

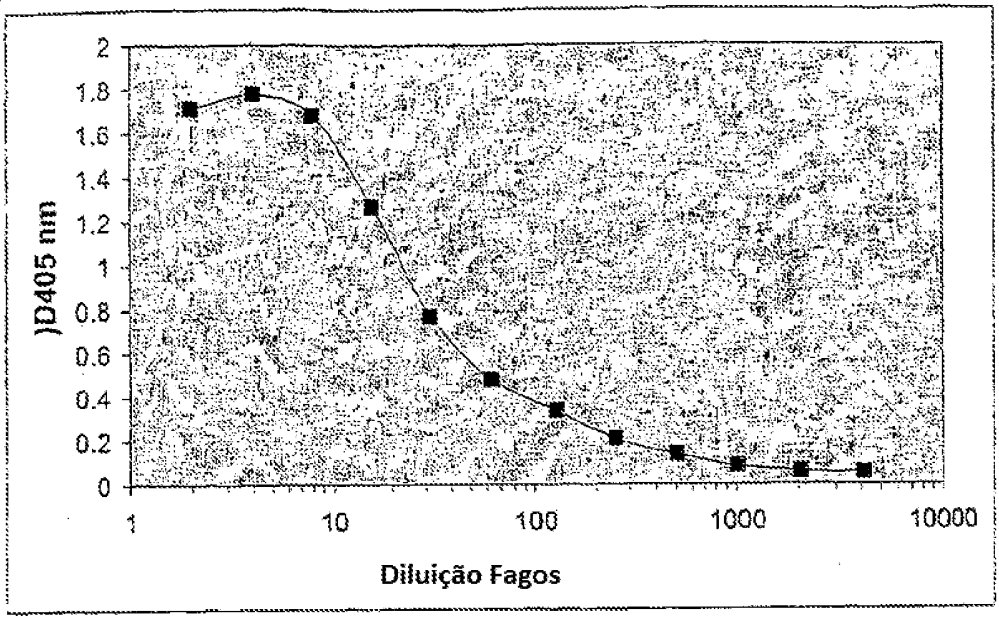


Figura 2

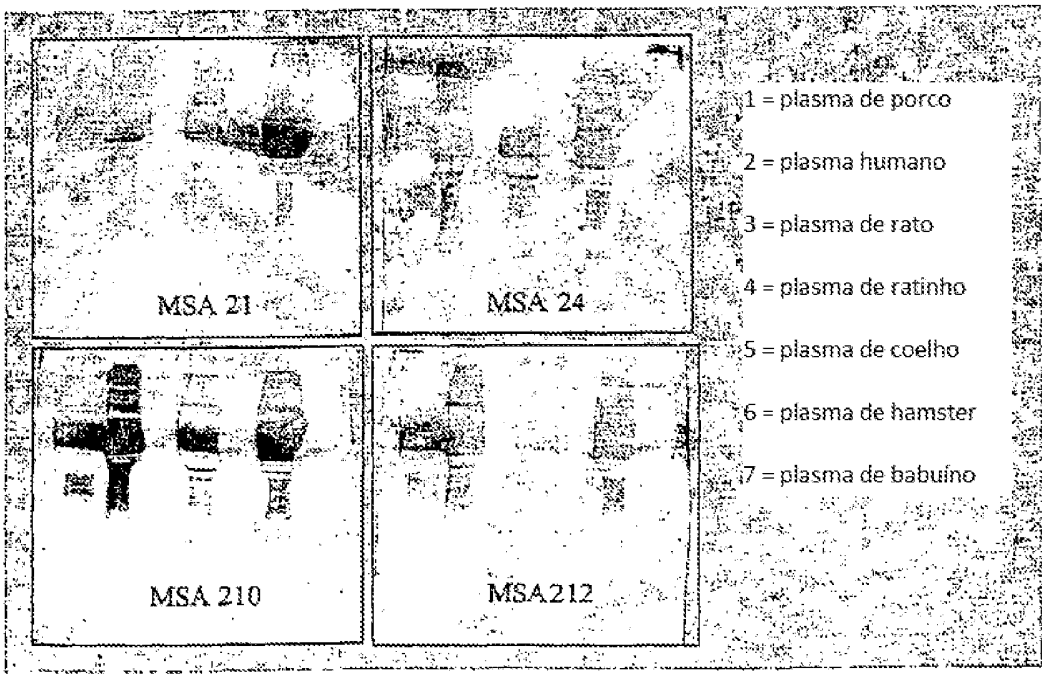


Figura 3

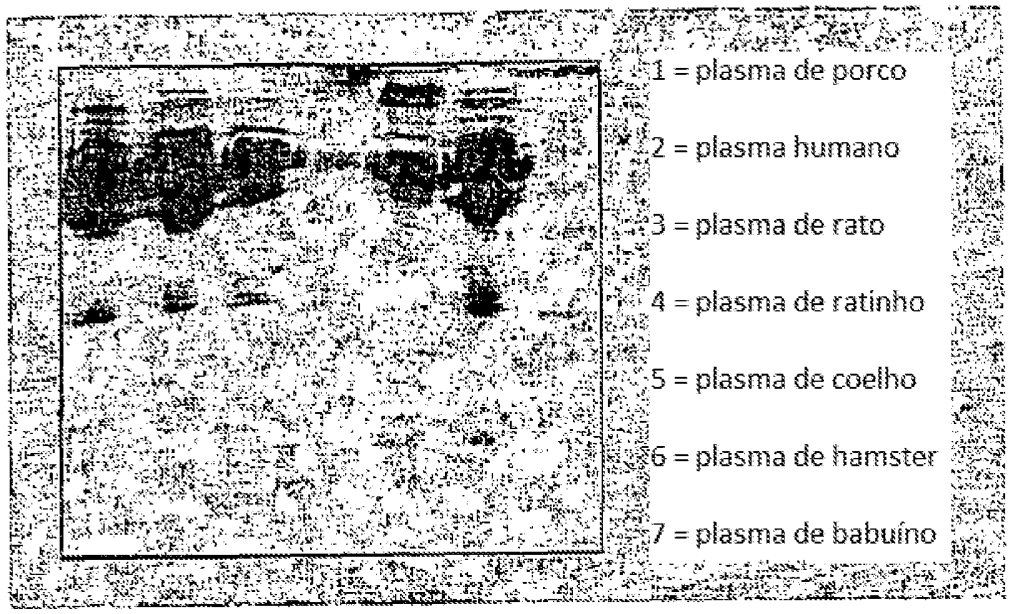


Figura 4

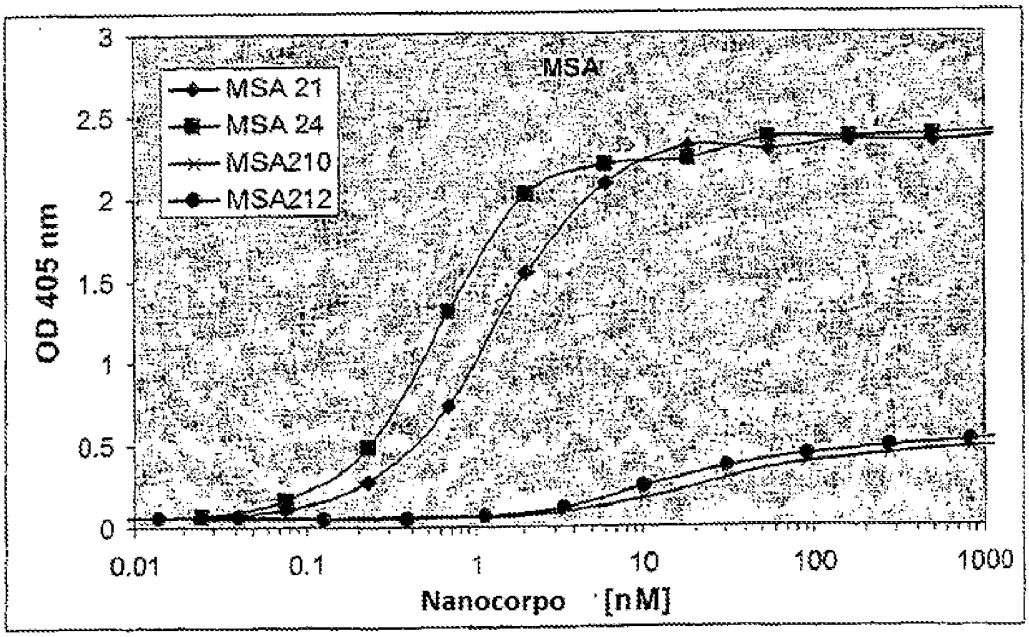


Figura 5

```
    HindIII
  1 aagcttgcat gcaaatttct tttcaaggag acagtcataa tgaaatacct attgcctacg gcagccgctg gattgttatt
                                                M  K  Y   L  L  P  T   A  A  A   G  L  L  L
                                                      <                    pelB-leader

                  SfiI     NcoI                 NotI                 PstI
 81 actgcggccc cagccggcca tggggcctaa taggcggccg cacaggtgca gctgcaggag tcataatgag ggacctaggt
      L  A  A   Q  P  A   M  G  P  -   -  A  A   A  Q  V   Q  L  Q  E   S  -  -   G  T  Q  V
            Leader            ><     VHH#1 >          <                              VHH#2

    BstEII
161 cacccgtctc tcgaaacaaa aactcatctc agaagaggat ctgaatgggg ccgcacatca tcatcatcat cattaatgag
      T  V  S   S  E  Q   K  L  I   S  D  E  D   L  N  G   A  A  H   H  H  H  H   H  -  -
                  ><       C-MYC                    >           <       His6          >

    EcoRI
241 aattcaccgg ccg
```

Figura 6

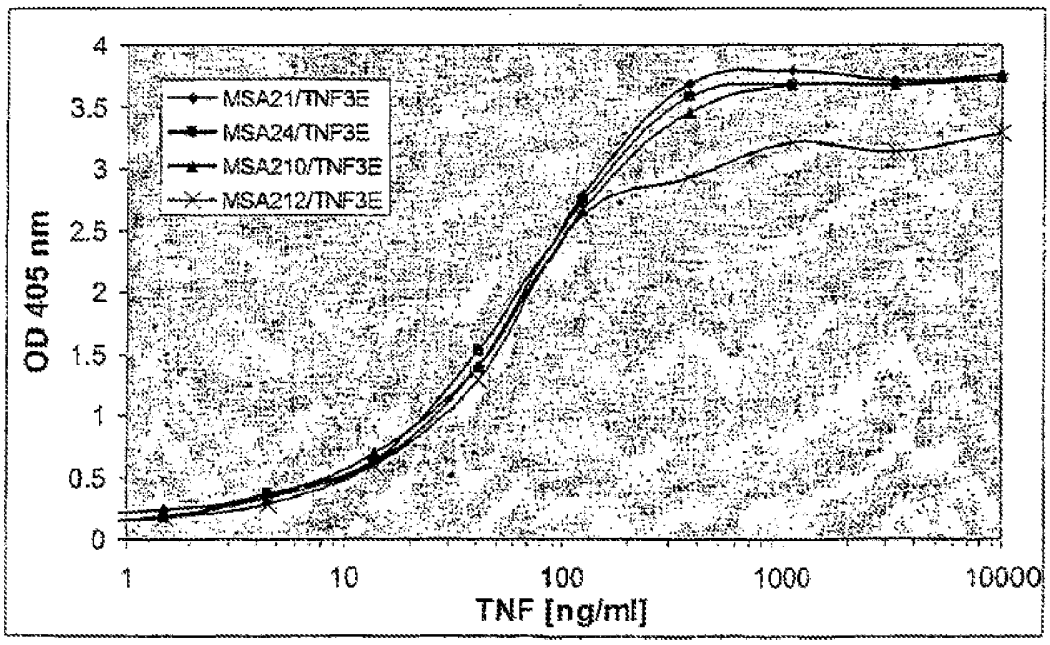
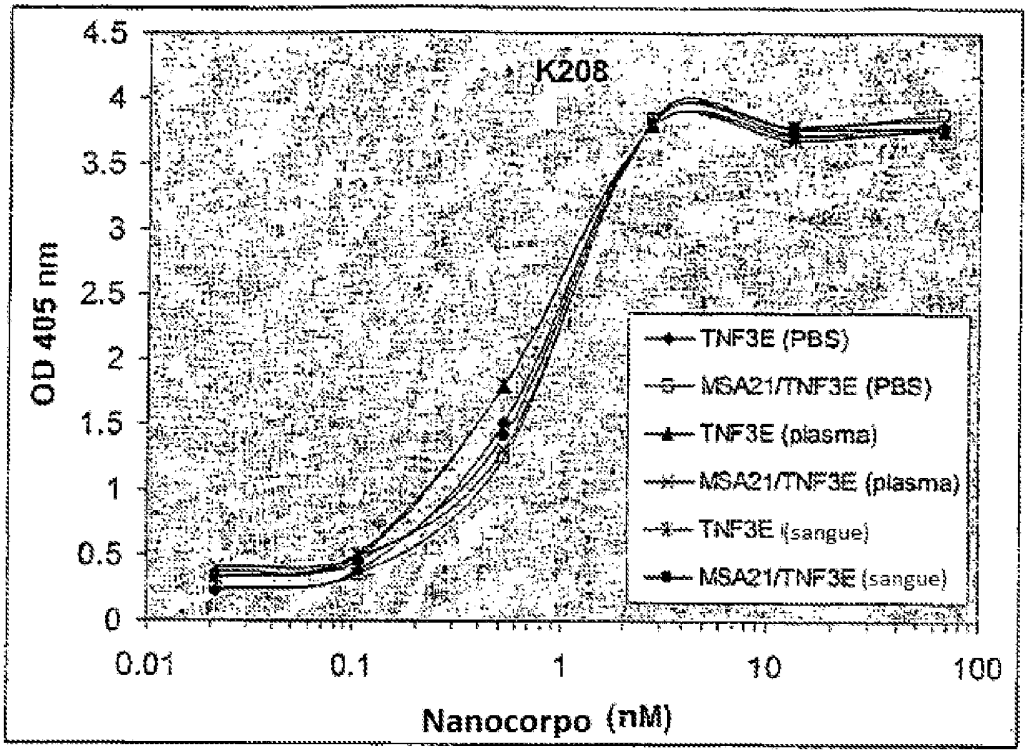


Figura 7


K208
OD 405 nm
Nanocorpo (nM)
TNF3E (PBS)
MSA21/TNF3E (PBS)
TNF3E (plasma)
MSA21/TNF3E (plasma)
TNF3E (sangue)
MSA21/TNF3E (sangue)

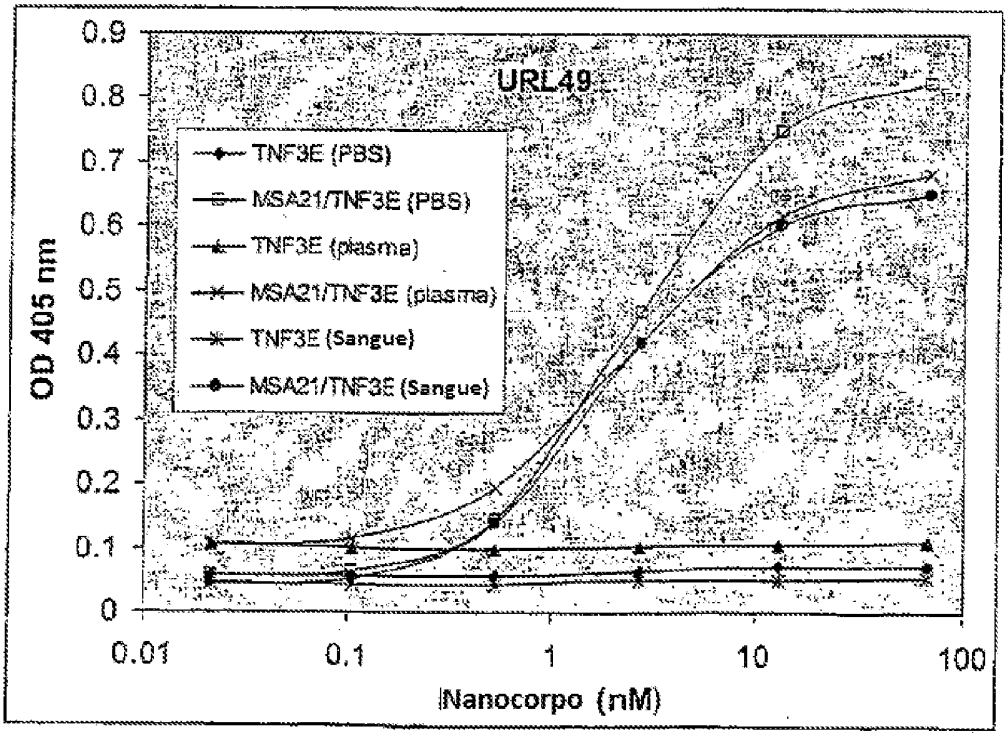

URL49
OD 405 nm
Nanocorpo (nM)
TNF3E (PBS)
MSA21/TNF3E (PBS)
TNF3E (plasma)
MSA21/TNF3E (plasma)
TNF3E (Sangue)
MSA21/TNF3E (Sangue)

Figura 8

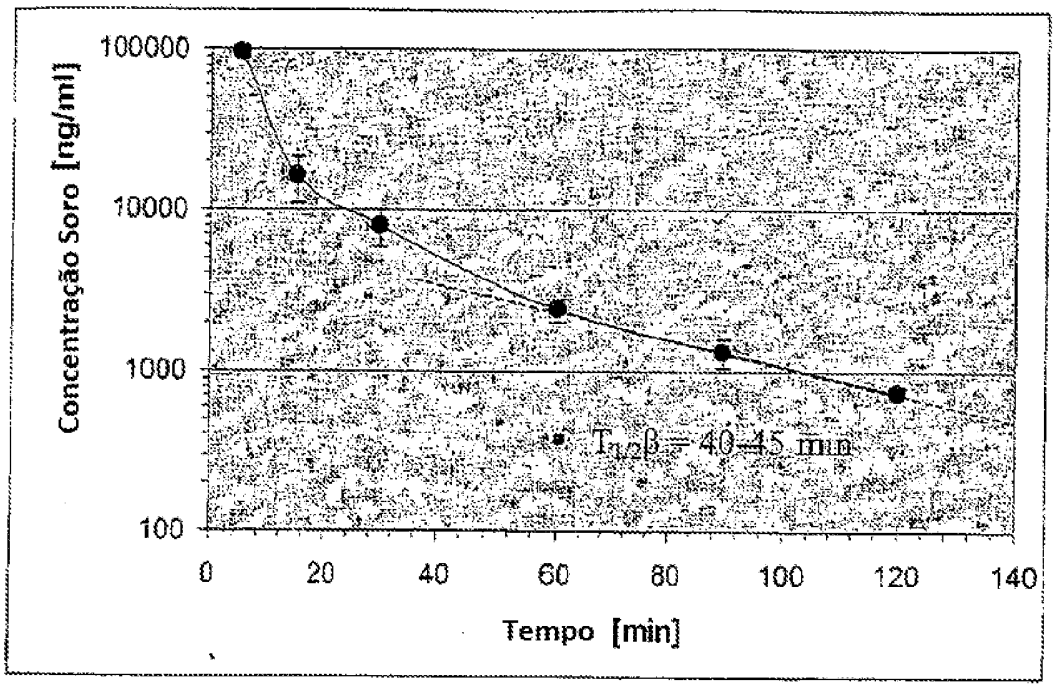


Figura 9

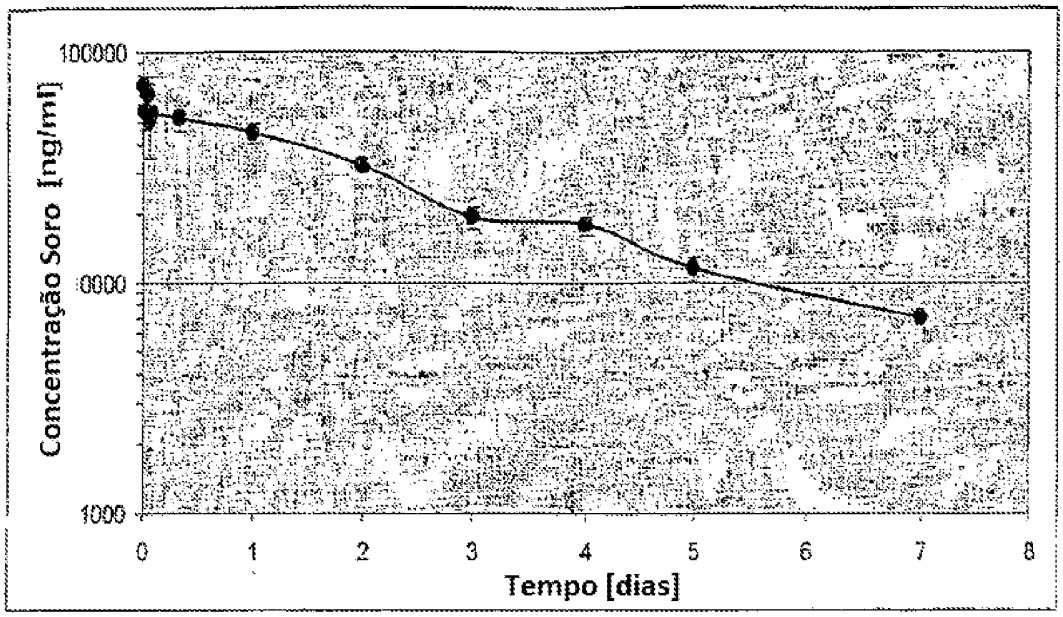


Figura 10

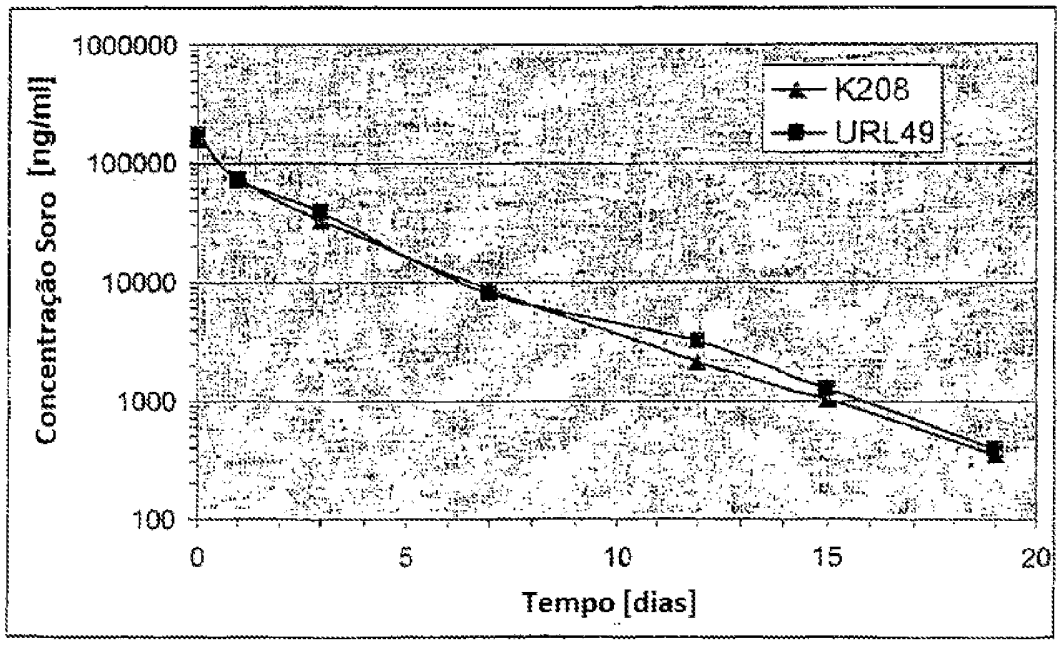


Figura 11

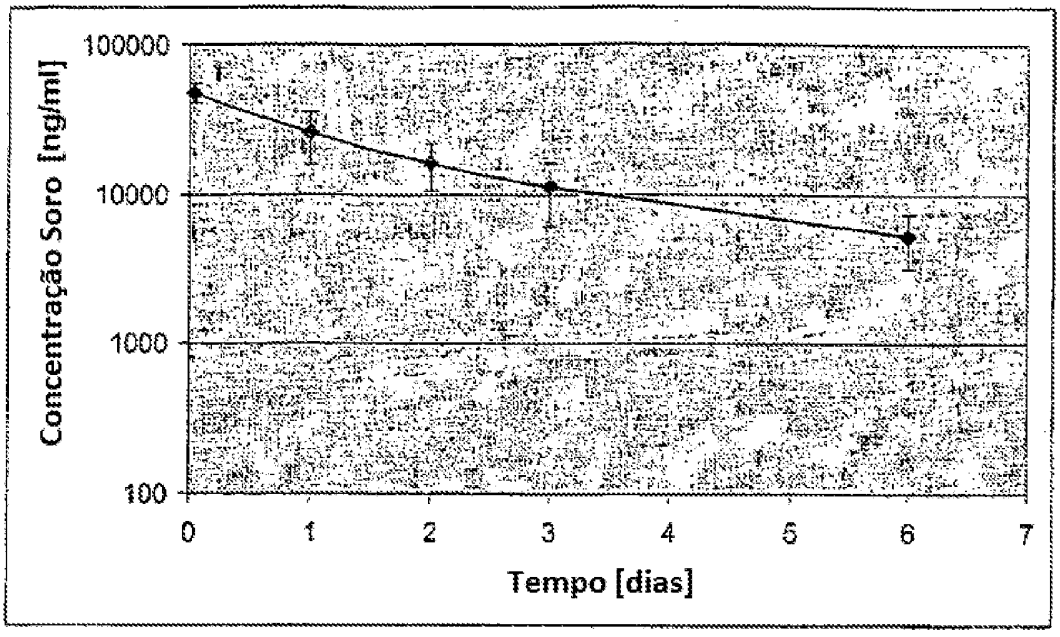


Figura 12

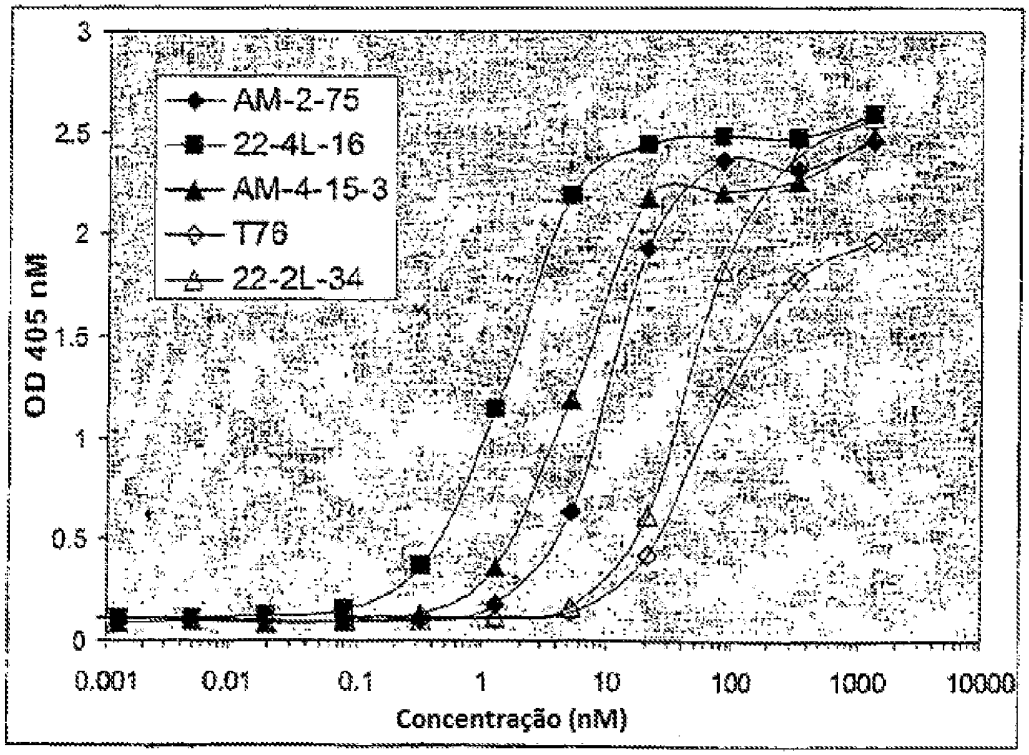


Figura 13

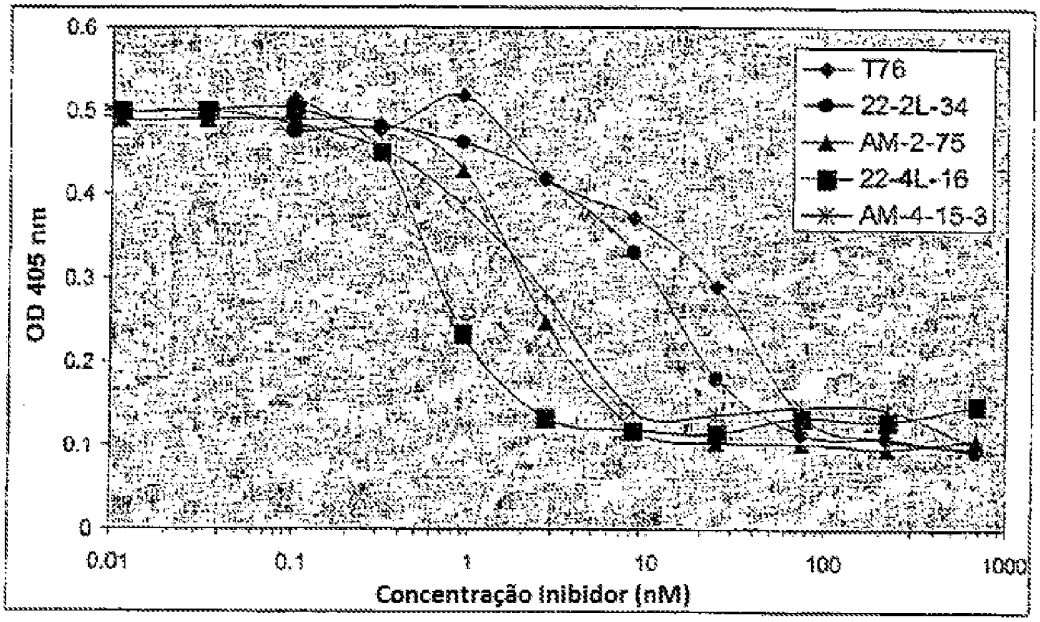
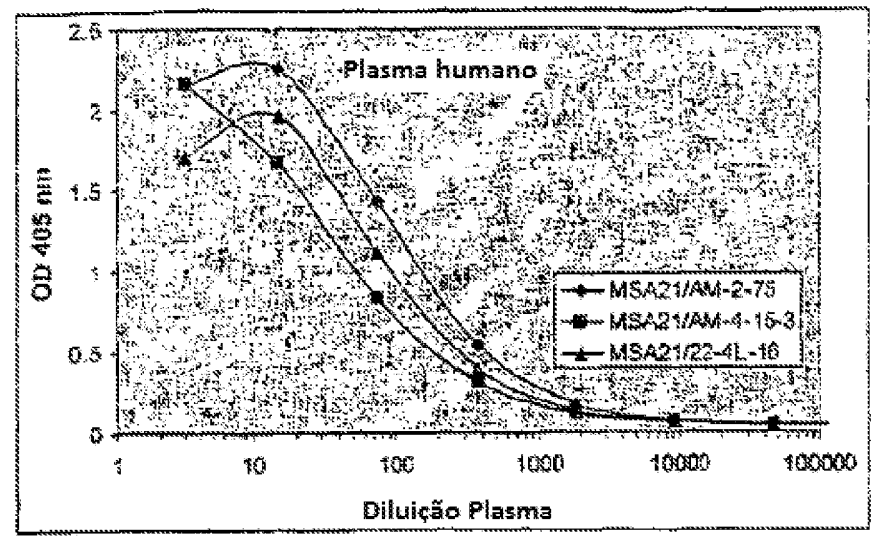
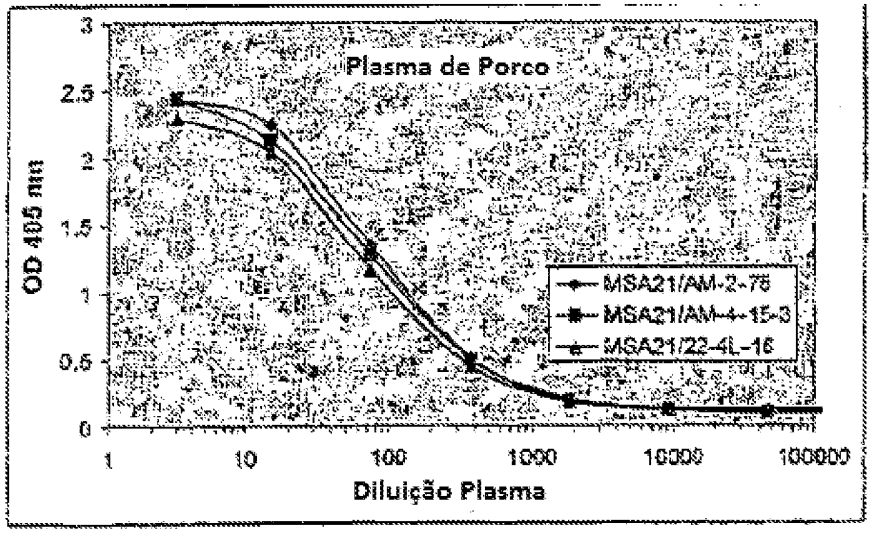


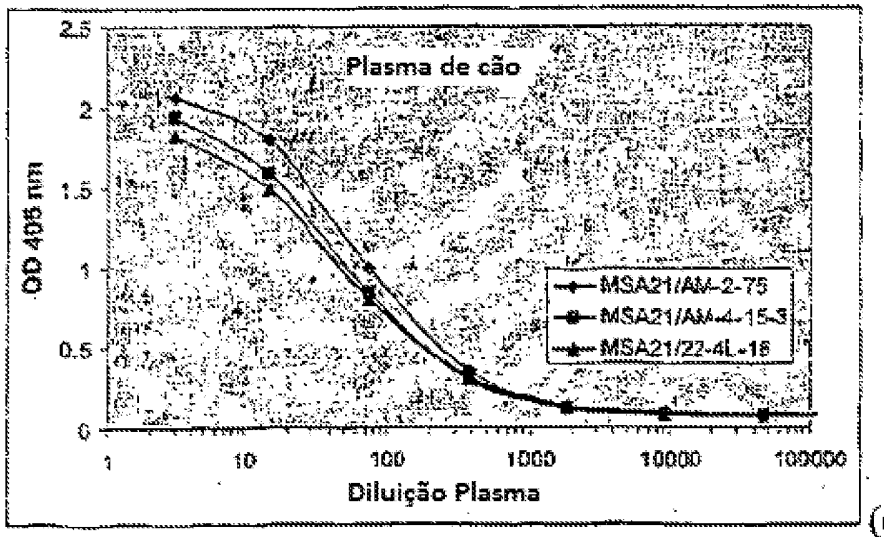
Figura 14



(a)



(b)



(c)